

Série A. N° 2988
N° d'Ordre
3860

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ès-SCIENCES NATURELLES

PAR

Philippe Jacques LUTERAAN

1^{re} THÈSE. — DE L'ACTION DU MILIEU SUR LA MORPHOGENÈSE
ET SUR LE MÉTABOLISME DE QUELQUES CHAMPI-
GNONS CULTIVABLES.

2^e THÈSE — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 15 Juin 1956 devant la Commission d'examen

MM. PLANTEFOL	Président
ULRICH	{ Examineurs
CHADEFAUD.	



Série A. N° 2988
N° d'Ordre
3860

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ès-SCIENCES NATURELLES

PAR

Philippe Jacques LUTERAAN

1^{re} THÈSE. — DE L'ACTION DU MILIEU SUR LA MORPHOGENÈSE
ET SUR LE MÉTABOLISME DE QUELQUES CHAMPI-
GNONS CULTIVABLES.

2^e THÈSE — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 15 juin 1956 devant la Commission d'examen

MM. PLANTEFOL *Président*
ULRICH
CHADEFAUD. } *Examineurs*



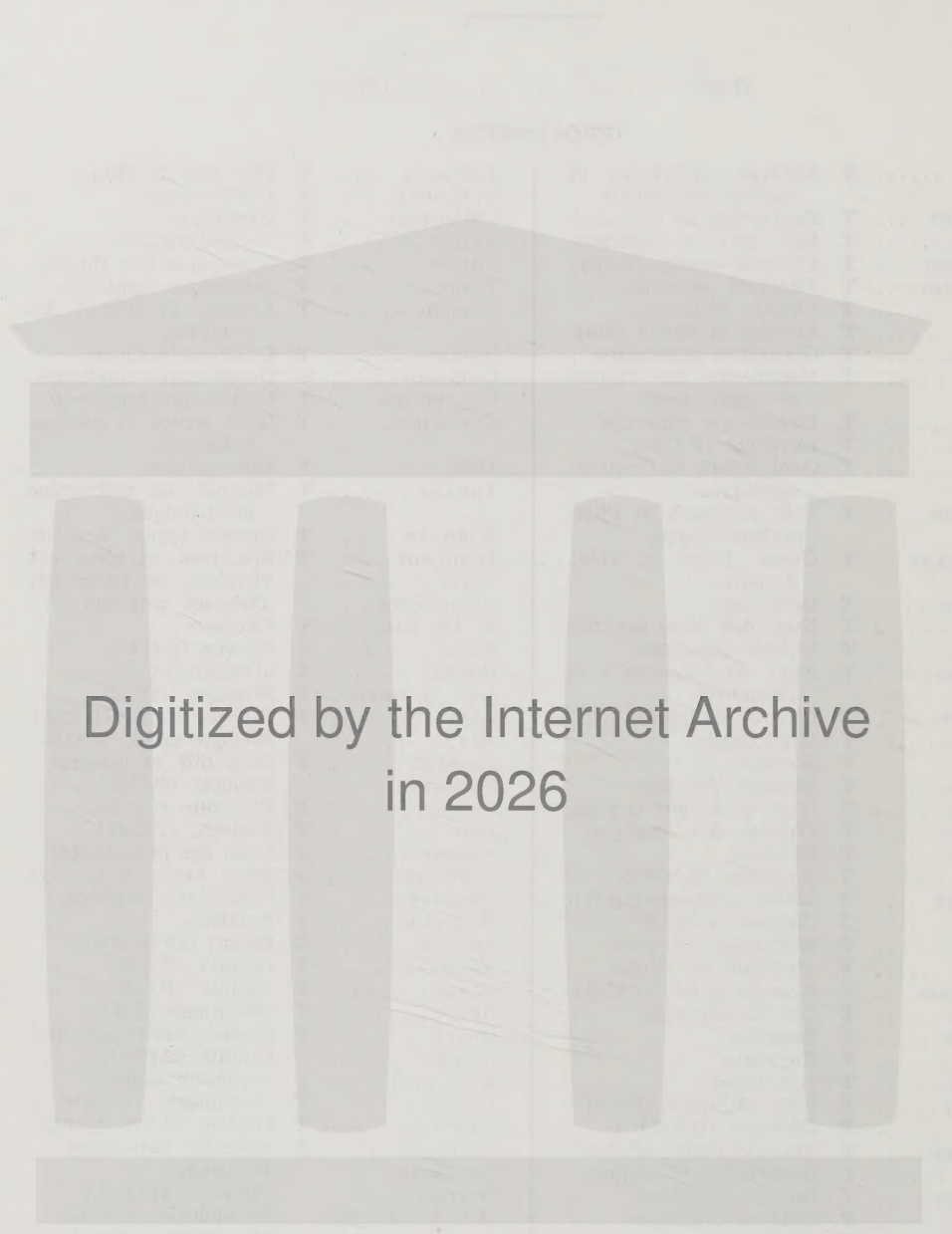
FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

Doyen J. PÉRÈS

PROFESSEURS

G. JULIA T	Analyse supérieure et Algèbre supérieure.	THELLIER T	Physique du Globe.
E. DARMOIS T	Enseignem. de Physique.	AUDUBERT T	Electrochimie.
FOCH T	Méc. phy. et expérim.	L'HÉRITIER T	Génétique.
PAUTHENIER T	Electrotechnique génér.	GRIVET T	Radioélectricité.
DE BROGLIE T	Théories physiques.	PONCIN T	Mécanique des fluides.
JOB T	Chimie générale.	THIERY T	Mécanique appliquée.
PRENANT T	Anatom. et Histol. comp.	DUBREIL T	Arithm. et théorie des nombres.
GARNIER T	Géométrie supérieure.	QUELET T	Chimie organique.
PÉRÈS T	Mécanique des fluides et applications.	CAGNIARD T	Géophysique appliquée.
LAUGIER T	Physiologie générale.	CHAMPETIER T	Chimie macromolécul.
M. CURIE T	Physique (P.C.B.).	CUVILLIER T	Géol. struct. et géologie appliquée.
BARRABE T	Géol. struct. et Géologie appliquée.	JUNG T	Pétrographie.
G. DARMOIS T	Calc. des prob. et Phys. mathématique.	TRILLAT T	Microsc. et diffraction électronique.
J. BOURCART .. T	Géogr. Phys. et Géol. dynam.	WIEMANN T	Chimie organ. structur.
PLANTEFOL T	Botanique.	JACQUINOT T	Spectrosc. et phys. cél.
GRASSÉ T	Evol. des êtres organis.	VASSY T	Physique de l'atmosph.
PRÉVOST T	Chimie organique.	DESTOUCHES ... T	Théories physiques.
BOULIGAND T	Appl. de l'analyse à la géométrie.	M. PRUVOST T	Géologie.
CHAUDRON T	Chimie appliquée.	AMIEL T	Chimie (P.C.B.).
WYART T	Minéralogie.	HOCART T	Minéralogie.
TEISSIER T	Zoologie.	J.-P. MATHIEU . T	Physique (P.C.B.).
MANGENOT T	Biologie Végétale.	COUTEAUX T	Biologie anim. (P.C.B.).
P. AUGER T	Phys. quantique et relat.	MAY T	Biologie anim. (P.C.B.).
MONNIER T	Physiol. des fonctions.	CHOQUET T	Calc. diff. et intégral.
PIVETEAU T	Géologie.	FELDMANN T	Biologie (P.C.B.).
ROCARD T	Physique (E.N.S.).	GUINIER T	Physique (P.C.B.).
H. CARTAN T	Mathématiques (E.N.S.).	JOST T	Biologie (P.C.B.).
LAFFITTE T	Chimie générale.	FORTET T	Calc. des probabilités.
FAVARD T	Mécanique générale.	SCHWARTZ T	Méth. math. de la phys.
COULOMB T	Physique du Globe.	CHOUARD T	Physiologie végétale.
Mlle COUSIN ... T	Biologie anim. (P.C.B.).	MALAVARD T	Aviation.
CHRÉTIEN T	Chimie minérale.	BRELOT T	Calcul différentiel.
P. DRACH T	Zoologie.	NORMANT T	Chimie (P.C.B.).
KASTLER T	Physique.	BÉNARD T	Chimie (P.C.B.).
EPHRUSSI T	Génétique.	BUVAT T	Botanique (E.N.S.).
WURMSER T	Biol. physico-chimique.	DUGUÉ T	Statist. mathématiques.
RIVIÈRE T	Géologie (S.P.C.N.).	GELOSO T	Chimie (S.P.C.N.).
GAUTHERET T	Biologie végét. (P.C.B.).	SOULAIRAC T	Psychophysiologie.
LUCAS T	Recherches physiques.	ULRICH T	Physiologie végétale.
A. THOMAS T	Biologie cellulaire.	MARÉCHAL T	Optique théor. et appl.
ARNULF T	Optique appliquée.	KIRRMANN T	Théories chimiques.
M. MORAND T	Physique.	CHADEFAUD T	Botanique.
SOLEILLET T	Physique.	DESTRIAU T	Physique (M.P.C.).
FORTIER T	Méc. expér. des fluides.	Mlle LE BRETON . T	Physiologie générale.
DANJON T	Astronomie.	SALEM T	Mathémat. générales.
FROMAGEOT T	Chimie biologique.	LELONG T	Mathémat. générales.
LAPORTE T	Phys. génér. et radioact.	DEVILLERS T	Anat. et histol. compar.
JANET T	Méc. anal. et mécan. céleste.	EHRESMANN T	Topologie algébrique.
PETIT T	Biologie maritime.	FRANÇON T	Physique (M.P.C.).
QUENEY T	Météor. et dyn. atmosph.	GLANGEAUD T	Géographie physique et géologie dynamique.
GALLIEN T	Embryologie.	GODEMENT T	Mathématiq. (M.P.C.).
EICHHORN T	Biol. végétale (P.C.B.).	PISOT T	Calcul des probabilités.
DE CUGNAC T	Biol. végétale (P.C.B.).	ROCH (E.) T	Géologie.
Mlle CAUCHOIS . T	Chimie physique.	SCHATZMANN ... T	Astrophysique.
		TERMIER T	Paléontologie stratigr.
		ZAMANSKY T	Mathémat. générales.

Secrétaire général Ch. MONIER



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555825_0064

A Monsieur le Professeur L. PLANTEFOL, qui nous a fait le grand honneur d'accepter la présidence de cette thèse, nous exprimons notre vive reconnaissance. Ses travaux sur la respiration des levures ont été pour nous un document de référence particulièrement précieux au cours de notre étude de la physiologie de certains de ces organismes.

A Monsieur le Professeur R. ULRICH, qui a bien voulu se charger du rapport de cette thèse, nous adressons tous nos remerciements et l'expression de notre haute considération.

A Monsieur le Professeur M. CHADEFAUD, qui a également accepté d'examiner ce travail, nous adressons nos très vifs remerciements pour l'intérêt qu'il a bien voulu attacher à nos recherches sur la morphogénèse chez les champignons, recherches pour lesquelles ses propres travaux et observations apportent des données de base particulièrement importantes.

Ce travail a été, en grande partie, accompli à l'Institut de Biologie physico-chimique sous la haute direction de Monsieur Th. CAHN. Nous le remercions de nous avoir accueilli dans son laboratoire après le décès de notre très regretté Maître M. LANGERON dont nous fûmes l'élève et le collaborateur à la Faculté de médecine. Nous sommes également redevables à Monsieur Jacques HOUGET, Directeur adjoint de ce même laboratoire, d'une aide matérielle considérable par ses connaissances techniques si vastes qu'elles nous étonnent toujours ainsi que par son enseignement si précis et si détaillé des méthodes chimiques que nous avons eues à employer.

A Monsieur le Professeur R. HEIM, Membre de l'Institut, nous adressons ici l'expression de notre vive reconnaissance pour l'intérêt qu'il a toujours porté à notre travail et pour les encouragements qu'il nous a constamment prodigués.

A nos Maîtres à la Faculté des Sciences de PARIS, Messieurs les Professeurs E. AUBEL, R. COMBES, M. FONTAINE, Cl. FROMAGEOT, A. GUILLIERMOND, G. MANGENOT, MONNIER, L. PLANTEFOL, G. SCHAEFFER, R. WURMSER dont l'enseignement, dépassant le cadre de cours préparatoires à des examens, enthousiasme tout chercheur, car il ouvre constamment la voie à de nouvelles hypothèses de travail.

TABIE SUCCINCTE DES MATIERES.

INTRODUCTION	page I
PREMIERE PARTIE Observations sur le développement des levures et du thalle de différents champignons filamenteux (suivies de dessins et clichés)	3
DEUXIEME PARTIE Action de certaines modifications systématiques du milieu de culture sur la morphogénèse	27
TROISIEME PARTIE De changements métaboliques correspondants à des modifications de leur forme, chez quelques champignons, sous l'action du milieu	43
QUATRIEME PARTIE Action de traces de substances diverses sur le métabolisme et modifications morphologiques consécutives	81
INTERPRETATION DES RESULTATS ET DISCUSSION	95
CONCLUSIONS	III
RESUME GENERAL	II9
BIBLIOGRAPHIE (ouvrages consultés)	I33
SOMMAIRE DETAILLE	I49

INTRODUCTION

Nous nous proposons, dans ce travail, d'examiner chez quelques champignons cultivables si, à des modifications bien déterminées et générales de leur forme, correspondent des changements caractéristiques de leur croissance, de leur comportement physiologique ainsi que de leur métabolisme et de leur composition chimique d'après quelques indications fournies par l'analyse de l'organisme et de son milieu de culture.

Nous avons choisi les champignons parce que, contrairement aux végétaux supérieurs, les rapports entre leur morphogénèse et leur métabolisme ont été peu étudiés. Pourtant, les recherches sont plus faciles chez eux pour les raisons suivantes :

- ils peuvent être plus plastiques que n'importe quel autre organisme.
- certains s'adaptent à des variations considérables des propriétés physiques et chimiques du milieu de culture qui peut être synthétique; ils présentent alors des réactions morphologiques et métaboliques dont nous examinerons la nature et l'importance.
- il n'y a pas de système méristématique qui, chez d'autres végétaux, oriente la croissance et la différenciation cellulaire.
- dans le sein du " complexe organisme-milieu " (RABAUD), le milieu extérieur exerce directement son action sur la matière vivante, donc sur le cytoplasme, sans interposition d'un milieu intérieur.

Certains de nos résultats s'appliquent également à des bactéries aérobies.

Notre exposé comporte quatre parties :

- nous décrivons d'abord nos observations concernant différents aspects macroscopiques ("développement par rapport à la surface des milieux") et microscopiques ("progression centrifuge du cytoplasme") au cours de la croissance de champignons divers.
- dans la deuxième partie, que l'on peut appeler de "morphologie expérimentale", nous examinons l'action, sur la forme, de diverses modifications du milieu extérieur, et nous y montrons une action similaire ou "convergente" de facteurs très différents.

- dans la troisième partie, nous complétons, chez quelques champignons, les constatations précédentes par la recherche d'indices d'un changement correspondant du métabolisme et de la composition chimique de l'organisme sous l'influence de facteurs qui modifient sa forme.

- la deuxième et la troisième partie conduisent à l'hypothèse qu'une action similaire de facteurs très différents sur la forme peut s'expliquer par une action préalable, similaire, de ces facteurs sur une activité physiologique commune qui serait d'ordre métabolique. La quatrième partie est consacrée à vérifier cette hypothèse. Nous introduisons dans le milieu de culture des traces de substances, presque toutes biologiques, et dont on sait, pour certaines du moins, qu'elles peuvent influencer profondément le métabolisme; nous examinons leur action sur la forme en même temps que sur le comportement physiologique, la composition du milieu et du champignon.

-:-:-:-:-

OBSERVATIONS SUR LE DEVELOPPEMENT DES LEVURES ET DU THALLE DE DIFFERENTS CHAMPIGNONS FILAMENTEUX.

Les recherches rapportées dans les deux premières parties du présent exposé ont été faites avec une centaine environ de levures et de champignons filamenteux différents : levures vraies et champignons levuriformes ; Ustilaginales à l'état levuriforme cultivable ; Gymnoascées, Aspergillacées, Hypocréales, Sordariées ; divers Adélomycètes : Sphéropsidales, Dématiées, etc... . Nous avons laissé volontairement de côté les Phycomycètes et les Autobasidiomycètes qui requièrent pour leur isolement, leur culture, leur étude surtout intéressante au point de vue des phénomènes de sexualité, des conditions et des techniques particulières . Certains de nos résultats s'étendent aux bactéries aérobies . Parmi les observations que nous exposerons, certaines confirment des faits connus, d'autres sont nouvelles et de celles-ci quelques unes ont été publiées, nous les rappelons pour donner à notre exposé la clarté nécessaire . Enfin, nous nous bornons à décrire des aspects du développement que nous obtenons en faisant varier les propriétés physiques et chimiques du milieu .

CHAPITRE PREMIER

DIFFERENTS ASPECTS MACROSCOPIQUES DE DEVELOPPEMENT DU THALLE .

Nous examinons les différents aspects macroscopiques du thalle, tant chez les levures que chez les champignons filamenteux, d'une façon nouvelle, en fonction de son développement par rapport à la surface de milieux de culture .

A . LEVURES ET CHAMPIGNONS LEVURIFORMES .

Rappelons que les levures comprennent deux groupes :

- celui des levures ascosporées qui sont des Ascomycètes : SACCHAROMYCES, PICHIA, HANSENULA, DEBARYOMYCES et d'autres genres moins importants.
- celui des levures anascosporées qui sont des Adélomycètes : CANDIDA, BRETTANOMYCES, TORULOPSIS, CRYPTOCOCCUS, RHODOTORULA, etc... ; elles sont appelées champignons levuriformes .

4

La plupart des levures se multiplie par bourgeonnement ; ces levures " blastosporées " sont des organismes particulièrement simples, réduits à un thalle, sans formation d'un " appareil sporifère " . D'autres levures que nous appelons " mycéliennes " se reproduisent par scissiparité, soit exclusivement (SCHIZOSACCHAROMYCES), soit aussi par formation de spores : ENDOMYCOPSIS dont les homologues anascosporés sont les TRICHOSPORON (par exemple TRICHOSPORON PULLULANS est l'ENDOMYCES VERNALIS employé par les biochimistes) .

Des " états levuriformes " peuvent être présentés par des champignons filamenteux, saprophytes ou parasites ; nous en examinerons ultérieurement quelques uns, nous ne retiendrons ici que le cas des Ustilaginales .

I . Observations sur milieux solides : formation de colonies de levures .

L'aspect des colonies varie suivant les espèces et suivant l'âge des cultures .

a . Colonie typique hémisphérique .

En ensemençant faiblement un point de la surface gélosée, il se forme une colonie hémisphérique, à surface lisse et brillante, à contours réguliers et nets, de consistance crémeuse ; elle est généralement blanche, mais si elle est pigmentée, la coloration apparaît d'abord au centre de sa surface pour s'étendre ensuite ; la colonie peut rester, un certain temps, blanche en profondeur alors qu'elle est pigmentée en surface . C'est là un aspect définitif ou simplement initial de colonies de nombreuses levures appartenant aux genres SACCHAROMYCES, HANSENULA, DEBARYOMYCES, TORULOPSIS, RHODOTORULA ainsi que d'Ustilaginales ; il est similaire chez de nombreuses bactéries aérobies : BACILLUS MEGATERIUM, SARCINA LUTEA, etc...

Ce type de colonie présente une taille limite ; elle dépend de l'espèce dans des conditions identiques de milieu et de culture ; cependant, nous constatons qu'elle varie, dans le sein d'une même espèce suivant les souches (DEBARYOMYCES, CANDIDA PULCHERRIMA, etc...) ; bien plus, avec une même souche, les isolements répétés permettent parfois d'obtenir de grandes et de petites colonies ; EPHRUSSI et coll. ont établi, chez un SACCHAROMYCES, sa relation avec l'existence de lignées à caractères physiologiques distincts .

Nous constatons, chez une même espèce, non seulement des variations de taille, mais de coloration, de surface (plis concentriques, radiés, ombilication centrale, etc...), des contours (lobés, crénelés, dentelés), soit de colonies différentes, soit localisées en secteur chez une même colonie . Le phénomène de secteur a été

étudié par PUNKARI et HENRICI chez *CANDIDA PULCHERRIMA*, par WINGE et LAUSTSEN chez des *SACCHAROMYCES*, par LANGERON et GUERRA chez des *CANDIDA*..Les auteurs danois montrent que les secteurs sont produits par des individus mutés qui sont à l'origine de lignées nouvelles..Leur fréquence est nettement plus grande chez certaines espèces. Nous les observons souvent à la suite de conditions de culture particulières; ainsi *HANSENULA ELLIPSOIDOSPORA*, au sortir d'épreuves de fermentation surtout si le sucre utilisé est complexe (raffinose) produit des secteurs. En ensemençant ensemble des organismes différents, mais vivant fréquemment en symbiose, par exemple *RHODOTORULA GLUTINIS* et *SARCINA LUTEA*, nous réalisons expérimentalement ce phénomène. L'intérêt de ces constatations est que nous sommes amenés, chez les levures, à considérer l'espèce comme une association symbiotique de lignées distinctes .

Nous rapprochons du phénomène de secteur l'isoantagonisme que nous pensons être les premiers à décrire chez les levures : une goutte de culture liquide est étalée à la surface d'un milieu solide, il se constitue des petites colonies, mais celles restent isolées ; ceci est fréquent avec les *DEBARYOMYCES* .

Une variante de la colonie typique décrite ci-dessus est la colonie coulante mucilagineuse, rencontrée chez *LIPOMYCES LIPOFERUS* (*TORULOPSIS LIPOFERA*), des *TORULOPSIS*, des *CRYPTOCOCCUS*, des *RHODOTORULA*, des Ustilaginales ; chez *RHODOTORULA MUCILAGINOSA*, nous obtenons, en variante, une colonie non coulante .

b . Colonies se développant en épaisseur .

Elles présentent, comme précédemment, une taille limite, mais le développement se fait nettement en épaisseur au dessus de la surface du milieu . C'est le cas de colonies de *SCHIZOSACCHAROMYCES OCTOSPORUS* en tâches de bougie superposées. *RUBROBACTERIOPSIS RUGOSA* forme une colonie épaisse, membraneuse à plis courbes, surélevés, se recouvrant et se coupant en tous sens ; les plis de dimensions constantes présentent deux bords saillants, surélevés et constamment parallèles, délimitant une gorge sinueuse, de profondeur égale .

c . Colonies membraneuses .

Nous avons vu que des colonies typiques peuvent présenter un secteur plissé. Le plissement peut apparaître d'emblée ou secondairement; il est variable, régulier ou non, épais ou mince, délimitant des anfractuosités plus ou moins étendues, profondes et abruptes; il se produit toujours au dessus de la surface du milieu, que les colonies aient une taille limite ou soient extensives. L'aspect membraneux

a souvent été considéré comme étant lié à un état filamenteux des levures, mais il y a des colonies lisses où l'on trouve une filamentisation et des colonies membraneuses où elle manque (par exemple RUBROBACTERIOPSIS RUGOSA). On trouve cet aspect notamment chez les espèces suivantes : PICHIA MEMBRANAEFACIENS, P. ASCOFILAMENTOSA, CANDIDA LIPOLYTICA, C. HUMICOLA, les ENDOMYCOPSIS, etc... .

d . Colonies extensives .

Les "colonies extensives" ont comme caractère principal de ne pas présenter une taille limite . La tendance extensive se manifeste d'emblée et la surface de la gélose se recouvre rapidement d'une colonie plate en forme de voile très mince, mat, à contours généralement irréguliers. L'exemple le plus typique est celui de CANDIDA KRUSEI, mais la tendance extensive se rencontre aussi chez les PICHIA, les CANDIDA HUMICOLA et LIPOLYTICA, les ENDOMYCOPSIS et TRICHOSPORON ainsi que chez nombre de champignons filamenteux, comme nous le verrons.

e . Colonies se développant en profondeur .

L'éventualité d'une extension en profondeur a été reconnue par LANGERON et TALICE (1932) chez CANDIDA ALBICANS et ils ont appelé cette forme de développement "immersion dans les milieux de culture solides". Avec LANGERON, nous avons établi qu'elle s'observe chez d'autres levures encore à condition qu'elles soient capables de "filamentiser"; ainsi l'immersion est précoce et importante chez les CANDIDA KRUSEI, TROPICALIS, LIPOLYTICA et HUMICOLA tandis qu'elle n'apparaît pas chez les TORULOPSIS, les CRYPTOCOCCUS, les RHODOTORULA, les CANDIDA UTILIS (ex TORULOPSIS UTILIS) et MYCODERMA (ex MYCODERMA VINI), les Ustilaginales. Les ENDOMYCOPSIS et TRICHOSPORON s'immergent..L'extension en profondeur fait toujours suite à un développement en surface, mais nous pouvons réduire celui-ci expérimentalement en favorisant l'immersion. La partie immergée du thalle présente fréquemment des zonations concentriques; elle est constituée de filaments rayonnant en éventail dans le sein de la gélose et dont les extrémités distales peuvent être éloignées de 10-12 mm de sa surface; l'aspect arborescent, étudié à la loupe, diffère d'une espèce à l'autre, mais d'une façon trop peu caractéristique pour permettre la détermination. Ce processus morphologique présente, avant tout, un intérêt physiologique, car tout se passe comme si le champignon, à partir d'un moment donné, "subissait une attraction en profondeur" ou "se soustrayait à l'action de l'espace aérien surmontant le milieu".

f . Résumé .

Nous aboutissons à une nouvelle classification de l'aspect macroscopique des levures en situant leur développement par rapport à la surface des milieux de culture solides, en opposant les colonies à taille limite aux colonies extensives alors que classiquement on ne distinguait que des colonies lisses et des colonies rugueuses. Nous pouvons tirer aussi deux conclusions importantes de cette étude :

- il y a hétérogénéité fréquente des colonies du fait de variations spontanées de taille, de pigmentation, de surface, de contours qui correspondraient génétiquement au développement de lignées distinctes dans le sein d'une espèce.

- il y a aussi hétérogénéité à la fois morphologique et physiologique des colonies en raison des différences d'âge et de situation des cellules qui la constituent : des cellules périphériques sont au contact de l'air, d'autres font partie d'un thalle immergé et sont adaptées à des conditions de vie confinant à l'anaérobiose ; tout ceci influe sur leur différenciation morphologique .

2 . Observations sur milieux liquides : la production de voile .

Certaines levures se développent en voile à la surface de milieux liquides, d'une façon précoce : *PICHLIA*, *HANSENULA*, les *CANDIDA KRUSEI*, *BRUMPTII*, *TROPICALIS*, *PELLICULOSA*, *LIPOLYTICA*, *HUMICOLA*, *MYCODERMA*, etc..., semi-tardive : *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* var. *ELLIPSOIDEUS*, *S. PASTORIANUS*, etc..., tardive : différents *DEBARYOMYCES*, les *CANDIDA TRIADIS* et *PULCHERRIMA*, etc.... Certaines levures forment simplement et tardivement un anneau à l'union de la paroi du récipient et de la surface liquide : *CANDIDA UTILIS*, diverses *Ustilaginales*, etc.... Tout peut se résumer à l'apparition très tardive d'îlots. Enfin de très nombreuses espèces ne forment ni voile, ni anneau : *SACCHAROMYCES ACIDIFACIENS*, *S. EXIGUUS*, *S. DELBRUCKII*, *S. FRAGILIS*, *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS*, etc.... Il n'y a pas de relation entre la capacité de former un voile et un autre caractère des levures, par exemple taille cellulaire, fermentation alcoolique, etc... .

Il y a d'abord croissance dans le sein du milieu liquide, puis apparaît une pellicule extrêmement mince, occupant d'emblée ou rapidement toute la surface liquide offerte et remontant, grimpant de plus en plus le long de la paroi du récipient. La croissance est alors très rapide et le voile s'épaissit, peut devenir membraneux, aspect qui ne correspond pas nécessairement ici aussi à une phase filamenteuse comme on le remarque chez *HANSENULA SATURNUS*. Dans tout ce développement on remarque la croissance de la profondeur vers la surface et la production

de voile se présente au début comme une " migration " de cellules vers celle-ci. Par la suite, le voile se désagrège en flocons ou en fragments imperceptibles qui tombent et constituent " le dépôt "; un deuxième voile mince peut se constituer lentement; il peut y avoir, après plusieurs semaines, un voile mince permanent au dessus de la surface du liquide clair surmontant le dépôt; nous en prélevons avec précaution un fragment chez *HANSENULA ELLIPSOIDOSPORA* et nous verrons qu'il constitue une lignée (" forme voile ") à caractères métaboliques distincts; nous pouvons par le même procédé isoler, chez une espèce donnant un voile tardif et mince une lignée produisant constamment et assez facilement un voile; nous expliquons ainsi que certaines souches de *CANDIDA ALBICANS*, par la sélection alors spontanée, donnent un voile (*CANDIDA TRIADIS*).

Nous reconnaissons à ce processus morphologique un certain nombre de caractères particuliers :

- l'ensemencement minime sur un milieu neuf identique d'un fragment de voile récent en reproduit un plus précoce et plus important; c'est une manière d'augmenter considérablement les récoltes.

- dans certaines conditions expérimentales, le voile peut " s'immerger " plus ou moins en masse suivant un processus similaire à l'immersion dans les milieux de culture solides.

- enfin, nous retrouvons, avec cette forme spéciale de colonie aérienne et de surface, l'hétérogénéité, non seulement primitive et génétique, mais secondaire, morphologique et physiologique, trouvée sur milieux solides .

B. CHAMPIGNONS FILAMENTEUX .

Nous étudions avant tout des Adélomycètes que nous avons isolés et déterminés suivant la classification de VUILLEMIN qui a le mérite de se baser sur les caractères de reproduction végétative en opposant les Thallosporés aux Conidiosporés qui ont un appareil distinct et spécialisé de formation de spores :

- THALLOSPORES	: Blastosporés	: Champignons levuriformes
	: Arthrosporés	: TRICHOSPORON, GEOTRICHUM, HORMODENDRON, etc
	: Aleuriosporés	: ALEURISMA, CTENOMYCES, etc...
- CONIDIOSPORES	: Sporotrichés	: SPOROTRICHUM à radula-spores exclusivement
	: Sporophorés	: SPOROPHORA, ACREMONIUM, etc...
	: Phialidés	: ASPERGILLUS, PENICILLIUM, PHIALOPHORA, etc...

Cette classification, si claire, est cependant incomplète, car elle ne tient pas

compte de ce que des modes différents de reproduction végétative peuvent se rencontrer chez un même champignon; elle néglige aussi la reproduction par pycnides si fréquente chez les champignons épiphyllés; enfin les Dématiées se distinguent moins par leur mode de reproduction (pas par pycnides) que par leur pigmentation mélanique, leur polymorphisme fréquent, leur ubiquité et leur facilité d'adaptation biologique qui fait qu'on les trouve sur les supports les plus divers.

a . Aspect typique habituel .

Il est généralement similaire sur milieux solides et sur milieux liquides; on peut distinguer au développement trois stades successifs :

- apparition et extension à la surface du milieu d'un mycélium pur, transverse ou couché

- formation à partir du centre de ce thalle d'un appareil sporifère aérien dressé et perpendiculaire à la surface du milieu; son développement concentrique laisse une zone mycélienne marginale libre par où le champignon continue de s'étendre.

- reproduction sexuée, souvent beaucoup plus tardive (à part certains ASPERGILLUS et CHAETOMIUM), débutant aux parties les plus anciennes du thalle. Ce schéma s'applique aux Aspergillacées et, reproduction sexuée mise à part, à nombre d'Adélomycètes : HORMODENDRON, etc... . Le thalle présente souvent des plis concentriques et radiés avec au revers un aspect ondulé ou cérébriforme.

b . Développement en hauteur .

Dans le type corémié des formations mycéliennes agrégées s'élèvent perpendiculairement à la surface de la gélose et se hérissent ensuite d'appareils sporifères à leur sommet ou sur toute leur longueur; nous avons rencontré des états ISARIA à appareil sporifère du type PENICILLIUM et des états GRAPHIUM à spores du type HORMODENDRON . L'apparition de ces formations corémiées peut être spontanée, mais c'est souvent un certain dessèchement du milieu qui la provoque.

c . Développement en épaisseur .

Les colonies spongieuses se constituent par développement en épaisseur au dessus de la surface du milieu; leur tendance extensive est restreinte; l'aspect final est celui d'une petite éponge déposée à la surface du milieu, parfois vivement colorée; l'isoantagonisme est fréquent; ces champignons ne se développent pas à la surface de milieux liquides. Nous rencontrons cet aspect chez des cham-

pignons appartenant à des groupes très différents : NOCARDIA qui font la transition entre les bactéries et les STREPTOMYCES, TORULA BERGERI (BERGER et LANGERON) qui est une Dématiéc, TRICHOPHYTON SCHÖNLEINI qui est une Gymnoascée, certains Phialidés aspergilloïdes ou pénicillioïdes dont les colonies se hérissent tardivement de petites formations corémiées sporifères, HEMISPORA STELLATA qui est, selon nous, un phialidé à grande collerette et à conidies spéciales (deutérocónidies qui se divisent par scissiparité); il s'agit donc d'un véritable état de convergence morphologique qu'on ne peut d'ailleurs obtenir expérimentalement .

d . Thalles glabres .

Décrits par LANGERON chez les Dermatophytes, nous les observons notamment chez les TRICHOPHYTON FERRUGINEUM et VIOLACEUM, des SCOPULARIOPSIS, des ALEURIOS-PORES avant la formation d'aleuries. Le thalle est glabre et sa surface lisse, brillante se confond avec la surface du milieu; il paraît être " immergé en surface"(LANGERON) .

e . Thalles immergés .

L'extension spontanée en profondeur du milieu solide a été reconnue par LANGERON et BAEZA (1936) chez TRICHOPHYTON MILOCHEVITCHI, puis par MILOCHEVITCH chez les TRICHOPHYTON LANGERONI, ALBUM et IMMERGENS. Depuis, nous avons établi que cette " immersion " est obtenue facilement chez les champignons filamenteux les plus divers en faisant varier les propriétés physiques et chimiques du milieu, ce qui contribue à éclairer la nature physiologique de ce processus. Nous observons qu'elle se produit aussi en milieu liquide avec des champignons se développant d'abord à sa surface..En milieu solide l'extension en profondeur se poursuit lentement sous forme d'un thalle glabre, donc dépourvu d'appareil sporifère, compact, parfois pigmenté comme un thalle développé en aérobiose alors qu'il se trouve dans la gélose jusqu'à 10-12 mm de sa surface.

Nous trouvons chez GEOTRICHUM CANDIDUM (ancien OIDIUM LACTIS) un exemple particulièrement net de tendance extensive et au développement en profondeur même en milieu liquide; il forme à sa surface un voile d'apparence immergée sans anneau qui s'étend en profondeur sous forme de zonations superposées pour occuper finalement toute la hauteur de la colonne liquide. Notons à ce propos que les aspects zônés ou d'extension pseudo-périodique sont très fréquents dans le cas de thalles glabres ou immergés.

f . Thalles levuriformes .

Le thalle de certains champignons filamenteux peut présenter un aspect qui se rapproche de celui de colonies de levures. Certaines Dématiées levuriformes appelées abusivement levures noires ou *TORULA NIGRA* forment une colonie hémisphérique typique dont la surface présente rapidement des plis circulaires et radiaux; au bout de quelques temps il y a développement mycélien et extension en profondeur avec un aspect de filamentisation qui rappelle celui de certaines levures; ce sont à notre avis de véritables états de convergence morphologique " levuriforme " d'abord, " filamenteuse " ensuite . Chez *TORULA DEMATIA* des hyphes aériens apparaissent à la surface de la colonie typique, la recouvrent et l'aspect est finalement celui d'une Dématiée banale.

g . Cas de certains champignons très polymorphes .

Ce qui précède nous permet de mieux comprendre les aspects si différents de *PULLULARIA PULLULANS* (de BARY et LÖW) BERKHOUT. Comme l'indique PLANCHON c'est probablement la plus polymorphe des Dématiées; cet auteur songe déjà à relier cette diversité à une action chaque fois différente du milieu, mais sans modifier ce dernier de façon systématique et sans s'appuyer sur des recherches quantitatives, mais les observations quantitatives contenues dans la thèse de PLANCHON (1900) sont précises et détaillées. MELIN et NANNFELDT (1934) constatent aussi cet énorme polymorphisme et émettent l'hypothèse que " *DEMATIUM PULLULANS* " serait un état à conidies bourgeonnantes de champignons différents appartenant au groupe des Pseudo-Sphaeriales et indistinguables sous cet état. Une première forme de *PULLULARIA* que nous avons rencontrée est celle d'une Dématiée banale avec hyphes aériens dont une excellente représentation est fournie par la figure 34 page 443 du mémoire de MELIN et NANNFELDT. Une deuxième forme, constatée déjà par PLANCHON page 184 a une apparence toute différente : il se forme une colonie ressemblant d'abord à celle d'une levure; elle devient plate et zonée tout en restant crémeuse en son centre; elle s'entoure finalement d'une couronne de filaments mycéliens rayonnants qui se pigmentent à partir de leur extrémité proximale, le restant de la colonie étant rose saumoné. Si dissemblables que soient ces deux formes, elles correspondent à un même état *DEMATIUM* avec prédominance chez l'une de hyphes aériens, chez l'autre de la formation très abondante de conidies bourgeonnantes. Un troisième aspect, original, est celui de thalle immergé, pigmenté même en profondeur et dont le rayonnement filamenteux profond rappelle celui d'une levure. Divers aspects sont liés à la prédominance de formes de résistance (*chlamydospores*) : états fumagoides bien décrits par PLANCHON et que nous obtenons en milieux

liquides dans des conditions particulières étudiées ultérieurement. Il y a des états kystiques sous forme de masses cellulaires blanchâtres que nous obtenons en milieux liquides sous l'effet de substances toxiques (thiourée). L'aspect levuriforme sous forme d'une colonie crèmeuse rose saumonée est dû au développement presque exclusif de conidies-levures avec absence de pigment mélanique et pratiquement de mycélium. On peut passer d'un aspect, d'un état à l'autre avec d'ailleurs des aspects et états intermédiaires; cette réversibilité confirme qu'il s'agit d'un seul et même champignon. La plasticité extraordinaire de cet organisme nous a fait rechercher ses relations avec ses réactions physiologiques sous l'action du milieu et ses possibilités importantes d'adaptation .

h . Résumé .

Comme pour les levures, nous attribuons une grande valeur au type de développement des champignons filamenteux par rapport à la surface de milieux solides ou liquides .La diversité morphologique de même que la différenciation morphologique de ces organismes est beaucoup plus considérable que celle des levures. Cependant les aspects macroscopiques similaires présentés par des champignons très différents nous permettent de caractériser des états de convergence : certains sont bien connus (états ISARIA et GRAPHIUM par exemple), d'autres méritent d'être mis en évidence (convergences levuriforme et filamenteuse). Certains de ces organismes se prêtent à une recherche expérimentale aisée de la production de ces états, d'autres non et leur forme est alors relativement fixe .

CHAPITRE SECOND

DIFFERENTS ASPECTS MICROSCOPIQUES DE DEVELOPPEMENT DU THALLE

Nous les décrivons non seulement d'après nos observations sur milieux de culture d'entretien et expérimentaux, mais d'après celles que nous avons faites en cultures sur lames gélosées. Cette méthode, introduite par KOCH en microbiologie générale, a été appliquée par RIVALIER et SEYDEL à l'étude des Dermatophytes, par LANGERON et GUERRA à celle des levures; récemment nous lui avons apporté des perfectionnements qui la rendent aisément praticable, mettent à l'abri des contaminations et augmentent le nombre des renseignements qu'elle peut fournir. Avec M. LANGERON nous avons créé de nouvelles méthodes de coloration destinées à mettre en évidence les ascospores et les chlamydo-spores. Avec GUYOTJEANNIN, nous

avons réussi à étendre la méthode de FEULGEN-ROSSENBECK aux cultures sur lame. Grâce à l'emploi de ces diverses techniques, nous pouvons examiner, sur des préparations qui se conservant, l'évolution du cytoplasme au cours de l'extension du champignon et indiquons à ce sujet l'intérêt tout particulier de la technique de culture sur lame qui permet de suivre le développement en fonction du temps et de comparer sur une seule et même préparation des stadés différents d'évolution.

A . LEVURES ET CHAMPIGNONS LEVURIFORMES .

Au cours de l'étude microscopique du développement d'une levure, nous examinons son mode de multiplication, l'élongation cellulaire et la filamentisation, les processus de conjugaison, l'asco- et la chlamydo sporulation éventuels.

I . Le mode de multiplication cellulaire .

Il n'y a pas d'appareil producteur de spores, ni même d'appareil sporifère; il y a reproduction directe du thalle soit par bourgeonnement, éventualité la plus banale, soit par scissiparité.

a . Le bourgeonnement .

Quand on examine une colonie jeune ou un fragment de voile récent d'une levure blastosporée, on est frappé par l'abondance des cellules bourgeonnantes avec cytoplasme dense, sans courants cytoplasmiques visibles, sans vacuoles ni enclaves alors que le contenu cellulaire est fortement iodophile. En effet lorsque la cellule a atteint une certaine taille, elle émet au voisinage d'une de ses extrémités un bourgeon et celui-ci n'est bientôt plus relié à la cellule-mère que par un pédicule étroit destiné à se résorber, la cellule-fille devient indépendante. Il en est également ainsi pour les voiles où les cellules sont en réalité indépendantes et n'adhèrent que par leur capsule. Cependant soit chez certaines espèces (par exemple RUBROBACTERIOPSIS RUGOSA), soit dans des conditions particulières (dessèchement du milieu) nous remarquons une " liaison cellulaire " persistante que met parfaitement en évidence l'emploi de bleu coton acétique. Au cours du bourgeonnement le noyau est en retrait de l'avancée cytoplasmique et souvent nous ne constatons sa division que lorsque le bourgeon est nettement constitué; l'un des noyaux peut ne s'engager dans le bourgeon que lorsque celui-ci est près d'être autonome. L'aspect du bourgeonnement est parfois caractéristique d'un genre ou

d'une espèce; ainsi il est à base large chez les NADSONIA et SACCHAROMYCODES LUDWIGII; il se produit en n'importe quel point de la surface chez RUBROBACTERIOPSIS RUGOSA et un bourgeonnement profond peut simuler, à s'y méprendre, la scissiparité;

On peut constater aisément un fait habituellement méconnu parce qu'on néglige d'y porter son attention : les cellules dérivées les unes des autres par bourgeonnement se disposent suivant un ordre défini, centrifuge par rapport à la cellule mère; les cellules les plus jeunes constituent donc la zone périphérique des colonies par lesquelles elles s'accroissent. Toutefois lorsqu'une colonie a atteint sa taille limite, nous constatons que les cellules superficielles, donc les plus récentes, sont plus différenciées que les cellules profondes; cette constatation n'est paradoxale qu'en apparence, car la différenciation des cellules est due, en même temps qu'à l'arrêt de croissance, à l'action directe de l'atmosphère qui n'atteint pas les cellules profondes. Cette constatation est confirmée, dans le cas de RHODOTORULA, par l'absence ou la faiblesse de pigmentation des cellules profondes alors qu'elle est intense chez les cellules superficielles.

b . La scissiparité .

Le mycélium extensif peut se fragmenter ou non d'emblée en arthrospores; celles-ci s'accroissent indépendamment de sorte que la croissance du champignon est autant intercalaire qu'extensive et centrifuge. Chez SCHIZOSACCHAROMYCES OCTOSPORUS la scissiparité se produit en même temps que la formation de mycélium par clivage oblique de cellules épaisses, ceci expliquant le développement en épaisseur des colonies. Chez les ENDOMYCOPSIS et TRICHOSPORON, levures mycéliennes, il y a, suivant les espèces, soit prédominance du mycélium, soit de sa résolution en arthrospores, soit de production de spores suivant un processus rappelant le bourgeonnement profond avec une disposition variable.

2 . L'élongation cellulaire et la filamentisation .

Les blastospores peuvent s'allonger sans modifier leur calibre; ainsi se constituent, suivant un processus dit d'élongation cellulaire des cellules plus ou moins tubulaires appelées éléments pseudo-mycéliens en raison de leur ressemblance avec un élément mycélien quand plusieurs d'entre eux sont contigus; nous constatons que les éléments pseudo-mycéliens sont uninucléés comme les cellules d'origine. L'élongation se produit de proche en proche si bien que, en culture sur lame, les cellules les plus proximales sont les plus élongées tandis que les

cellules les plus jeunes et périphériques ont la taille normale de blastospores. Nous définissons un coefficient d'élongation moyenne comme rapport de la longueur d'une cellule élongée à celle d'une blastospore.

Par suite de la diminution de la densité cytoplasmique due à l'élongation, les courants cytoplasmiques ressortent avec évidence : ils sont pariétaux, unis par des travées, entraînent des inclusions et des globules lipidiques qui confluent en enclaves à mesure que les courants cytoplasmiques s'amenuisent. On remarque que le cytoplasme est constamment plus dense au niveau des cellules périphériques les plus jeunes et qu'il tend à abandonner les éléments pseudo-mycéliens après s'être accumulé à leur extrémité distale. Ce processus de "migration du cytoplasme" des cellules les plus âgées vers les plus jeunes a été reconnu par BULLER chez les champignons filamenteux et s'étend aux levures, il est permanent et orienté suivant un sens centrifuge; nous préférons l'appeler "progression centrifuge du cytoplasme", ce qui ne préjuge pas de sa nature cytophysiologique.

Le cytoplasme tendant à se rassembler constamment au pôle distal de l'élément pseudo-mycélien, celui-ci se trouve être le siège de bourgeonnements successifs et multiples, nous appelons ce processus "polybourgeonnement distal". Chaque bourgeon est à l'origine d'une blastospore ou d'un élément pseudo-mycélien nouveau et il se constitue, d'une façon ordonnée sous l'effet de la progression centrifuge du cytoplasme qui continue de se manifester, un appareil pseudo-mycélien ou pseudo-mycélium, base de la filamentisation des levures étudiée dans le genre CANDIDA par LANGERON et ses collaborateurs; nous donnons des schémas de cette organisation pseudo-mycélienne, mais elle varie chez une même espèce et il y a des cas intermédiaires, ce qui restreint considérablement sa valeur de critère morphologique spécifique. Par contre, en tant qu'élément de différenciation morphologique, la filamentisation des levures présente un intérêt tout particulier : elle est particulièrement précoce et intense chez des levures présentant un développement extensif rapide, par exemple CANDIDA KRUSEI (coefficient d'élongation 4), CANDIDA HUMICOLA et LIPOLYTICA (coefficient 6). Ces organismes ont un pseudo-mycélium qui pénètre la gélose et se développe dans sa profondeur tout en conservant, c'est là le fait le plus remarquable, la structure et les caractères du pseudo-mycélium de surface : le cytoplasme progresse donc vers la profondeur de la gélose et il y a constitution en amont de ce cytoplasme qui progresse d'enclaves lipidiques, constatation que nous ne faisons jamais chez des cellules de levures développées en anaérobiose restreinte. Corollairement, nous observons que des levures n'ayant pas de tendance extensive en surface ou au

développement en profondeur ne présentent qu'une élongation cellulaire et une filamentisation réduites ou nulles; c'est le cas de divers *SACCHAROMYCES*, des *CRYPTOCOCUS*, des *TORULOPSIS*, des *RHODOTORULA*. Avec d'autres *SACCHAROMYCES*, des *DEBARYOMYCES*, des *PICHLIA* et des *HANSENULA* nous observons des phénomènes intermédiaires : l'élongation cellulaire et la filamentisation apparaissent dans certaines conditions, leur importance varie en fonction de l'action du milieu, ce qui permet d'étudier d'une façon étroite celle-ci et, par récurrence, la signification physiologique de ces processus de différenciation morphologique.

3 . Les processus de conjugaison .

Ils sont rarement mis en évidence bien que, depuis les travaux de GUILLIERMOND, on sache qu'ils précèdent la production d'asques. Les travaux de WINGE et LAUSTSEN font comprendre la rareté de cette constatation chez les *SACCHAROMYCES* haplo-diploïdes, seul cas étudié par eux : la conjugaison est obligatoire, mais l'haplo-phase très courte, terminée par la conjugaison, est masquée par le développement vigoureux du diplonte qui recouvre l'haplonte et peut être bien plus tard le siège de la production d'asques, si bien que les rapports entre celle-ci et les processus de conjugaison peuvent échapper (fausse parthénogénèse).

Il nous revient d'avoir reconnu que certaines levures sont haploïdes et homozygotes. C'est le cas de *SACCHAROMYCES ACIDIFACIENS*, levure découverte par NICKERSON qui montre chez elle la conjugaison par tube entre blastospores. Nous avons observé que les éléments pseudo-mycéliens sont aussi le siège de processus de conjugaison, soit typique par tube entre deux cellules voisines, soit atypique entre une cellule pseudo-mycélienne et son produit de bourgeonnement; nous trouvons tous les intermédiaires entre la conjugaison typique et la parthénogénèse apparente; typique ou atypique, la conjugaison est suivie immédiatement de la production d'asques. Ces constatations s'étendent à deux *PICHLIA* : *P. FARINOSA* et *P. ASCOFILAMENTOSA* n. sp., à *HANSENULA ELLIPSOIDOSPORA* n. sp., mais nous ne constatons qu'une conjugaison atypique entre une cellule pseudo-mycélienne et son produit de bourgeonnement. Notons qu'il n'y a jamais de conjugaison entre les éléments pseudo-mycéliens chez les *SACCHAROMYCES* haplo-diploïdes.

Chez l'ensemble des levures haploïdes précédentes, nous faisons l'observation originale suivante dont nous tenons à souligner l'importance : la conjugaison suit immédiatement, dans le temps et dans l'espace, la progression centrifuge du cytoplasme; elle se produit donc au niveau d'un cytoplasme résiduel dont nous

remarquons les changements d'affinité tinctoriale à l'égard des colorants acides, d'après notre technique personnelle. Ceci prouve que la progression centrifuge du cytoplasme n'est pas une apparence due à une dégénérescence supposée du cytoplasme en amont, car le cytoplasme résiduel des éléments pseudo-mycéliens demeure bien vivant, est le siège de processus de conjugaison, puis de la formation d'asques.

4 . La formation d'asques .

Il y a remaniement profond du cytoplasme après conjugaison et les ascospores s'isolent vite en masses distinctes qui acquièrent, en mûrissant, une affinité croissante pour l'éosine de HÖCHST, l'érythrosine phéniquée de WINOGRADSKY, la fuchsine acide, le vert lumière, la safranine anilinée, l'orseilline BB, l'écarlate de BIEBRICH, le BORDEAU B, le jaune de métanile, etc... préparés suivant la technique de MANEVAL, affinité que fait ressortir l'emploi de contre-colorants tels que le bleu diamine 2B, le bleu trypan, le bleu coton C4B acétique (nous avons recherché s'il y avait une relation entre l'affinité de ces colorants et leur structure; si, dans les azoïques employés, il y a un groupe amine, l'affinité disparaît; avec les divers colorants non azoïques, il faut un ou plusieurs groupes méthyle). Par ces méthodes originales, nous avons pu, pour la première fois, mettre en évidence la formation des ascospores dans les cultures sur lames gélées ainsi que le montrent nos clichés; ce type de culture semble d'ailleurs favoriser beaucoup leur production; le siège des asques, la disposition, la forme et la taille si caractéristiques des ascospores apparaissent nettement.

5 . La chlamydosporulation .

Elle se produit, de même que l'ascosporulation, en amont de la zone de progression centrifuge du cytoplasme et nous avons trouvé que les affinités tinctoriales des chlamydospores sont les mêmes que celles des ascospores; d'ailleurs M. LANGERON considérait les ascospores comme des chlamydospores fonctionnelles, point de vue que nous adoptons. L'exemple le plus classique est celui de CANDIDA PULCHERRIMA qui forme facilement des chlamydospores ou cellules pulcherrima de BEIJERINCK à parois épaisses avec double contour arrondi net et pigmentées avec pigment brun rouge pouvant diffuser dans le milieu; ces cellules contiennent des enclaves lipidiques et signalons à ce propos que les ascospores peuvent également s'enrichir en graisses. CANDIDA ALBICANS présente un singulier dimorphisme :

après apparition du pseudo-mycélium ordinaire, il y a formation possible d'autres rameaux porteurs uniquement de chlamydospores latérales ou terminales.

6 . Résumé .

Cette étude successive de la multiplication cellulaire, de l'élongation et de la filamentisation, de la conjugaison et de l'ascosporulation, de la chlamydosporulation chez les levures nous a permis de reconnaître leurs relations avec un processus général qui ne semble pas avoir fait l'objet de recherches chez ce groupe de champignons : la progression centrifuge du cytoplasme responsable de la croissance terminale (REINHARDT 1892) et centrifuge (BULLER 1933). Cette progression a donc un rôle fondamental dans la morphogénèse et la différenciation morphologique; sa connaissance nous permet de relier les aspects macroscopiques du développement par rapport à la surface des milieux de culture avec les phénomènes microscopiques.

B . CHAMPIGNONS FILAMENTEUX .

Les variations de leur aspect microscopique ne sauraient être énumérées tant elles sont nombreuses; nous avons écarté volontairement l'examen des caractères microscopiques se rapportant soit à des états parasitaires, soit à des phénomènes de sexualité en fonction desquels on définit l'évolution par cycles. Nous cherchons seulement à préciser certaines modalités d'évolution morphologique chez des champignons cultivables, surtout des Adélomycètes, en fonction de la progression centrifuge du cytoplasme qui se manifeste dans l'extension mycélienne et le développement de l'appareil sporifère. Nous décrivons aussi certains processus de bourgeonnement et de scissiparité chez des champignons relativement peu différenciés qui représentent, à notre avis, une étape phylogénique entre les champignons levuriformes et les champignons filamenteux .

I . L'extension mycélienne .

Elle comporte trois processus morphologiques majeurs : l'allongement des membranes, la progression centrifuge du cytoplasme, la constitution secondaire de cloisons frontales .

a . L'allongement des membranes .

Les membranes s'allongent à leur extrémité suivant un mécanisme encore inconnu et d'une façon qui n'est pas obligatoirement symétrique comme le démontrent les flexuosités fréquentes du mycélium. Chez *PULLULARIA PULLULANS*, nous remarquons que les parois s'épaississent et se pigmentent à mesure que les éléments mycéliens vieillissent, ce qui contraste, chez cette espèce, avec le fait que les conidies, capables de bourgeonner, conservent une paroi mince et non pigmentée.

Dans le cas de thalles immergés cet allongement de membranes est encore plus accentué et il est responsable de l'extension importante que peut prendre le champignon; cette élongation membranaire se manifeste, elle, comme chez les levures en amont de la zone périphtérique de croissance; cette élongation est aussi responsable des phénomènes macroscopiques de zonation ou d'extension pseudo-périodique qui varient concomitamment.

b . La progression centrifuge du cytoplasme .

Dans l'extension mycélienne on est frappé par le fait que le cytoplasme paraît presque entièrement rassemblé à la périphérie du thalle et c'est par elle que le champignon s'accroît (croissance terminale de REINHARDT). BULLER montre sur *RHIZOPUS NIGRICANS* et sur *PYRONEMA CONFLUENS* que des courants cytoplasmiques se dégagent un déplacement continu, ordonné et orienté du cytoplasme au cours duquel il quitte les parties les plus anciennes du thalle, suivant un sens centrifuge, pour s'accumuler constamment dans les extrémités des filaments où il y a en même temps allongement membranaire. LANGERON (1944) insiste avec raison sur l'importance et la portée de la découverte de BULLER et si, à la lumière de nos expériences, nous sommes conduits à concevoir différemment la nature et le mécanisme de ce phénomène, nous tenons à insister sur sa généralité et à en donner d'autres exemples :

- *ASPERGILLUS NIGER* présente d'abord un mycélium à tendance extensive précoce et rapide; le cytoplasme est le plus dense aux extrémités distales, en pleine croissance, de ce mycélium transverse ou couché; lorsque l'appareil sporifère aérien se développe à la surface de ce dernier, tout se passe comme si le mycélium achevait de se vider de son cytoplasme au profit de cet appareil et finalement le cytoplasme se rassemble dans l'ensemble des phialides. Cette constatation morphologique si simple est pourtant négligée des biochimistes; il en résulte sur une étude métabolique basée sur les modifications de composition chimique du milieu et de l'organisme, en s'adressant à l'organisme tout entier et sans s'occuper de

ses réactions morphologiques, ne peut fournir que des indications puisque chaque partie du champignon a une structure morphologique, différente, donc une activité physiologique distincte.

- Dans les thalles immergés il n'y a pas d'appareil producteur de conidies et nous constatons que le cytoplasme est le plus dense à l'extrémité des filaments mycéliens immergés, donc à l'extrémité la plus éloignée de la surface de la gélose, tandis que le restant du mycélium paraît plus ou moins vide de cytoplasme. En amont de la zone périphérique d'accroissement se forment des enclaves à partir de globules lipidiques apparus dans le cytoplasme plus jeune; ici encore on est frappé par le fait que les éléments immergés, donc soustraits à l'action directe de l'air, ont des caractères cytophysiologiques d'éléments développés en surface; la valeur de cette constatation est renforcée par celle de la pigmentation possible du mycélium immergé, la pigmentogénèse des organismes aérobies ne s'observant jamais que dans des conditions de culture en surface ou aérées.

c . La formation de cloisons mycéliennes .

Les champignons que nous avons utilisés se prêtent moins bien que ceux utilisés par BULLER à l'étude de la constitution secondaire de cloisons frontales. Selon WAHRlich (1893) elles sont d'abord incomplètes, laissant subsister un pore central au travers duquel continuent de se faire les échanges cytoplasmiques. Selon différents auteurs, dont BULLER, qui ont étudié cette question, ces cloisons, au travers desquelles on constate les communications cytoplasmiques ou plasmodemes, s'obturent complètement en amont de la zone de progression centrifuge du cytoplasme, mais nous trouvons parfois des plasmodemes très en amont.

2 . La production d'anastomoses .

Malgré son importance, cette progression centrifuge du cytoplasme n'exclut pas la constitution d'autres courants cytoplasmiques qui se manifestent notamment dans la production d'anastomoses. Celle-ci contribue fortement à la diversité d'aspects du mycélium et indiquons deux de ses caractères essentiels :

- les courants anastomotiques se forment toujours en amont de la zone de progression centrifuge du cytoplasme; ceci montre une fois de plus que le cytoplasme résiduel n'est nullement dégénéré et est susceptible de remaniements.

- ils manquent dans certains groupes de champignons filamenteux dont les Dématiées levuriformes et sont un indice de différenciation morphologique.

Les anastomoses sont, on le sait, de nature très variée : elles peuvent unir des mycéliums de calibre inégal, plus de deux mycéliums, un mycélium à lui-même comme une dérivation. On a pu considérer comme processus anastomotiques la formation de tubes de conjugaison, les fusions mycéliennes avant la production de zygospores, la formation d'anses ou de crochets au cours de la progression d'un mycélium diploïde. Elles peuvent concourir à la formation d'appareils complexes de production de spores : pycnides et spermogonies des Sphéropsidales où la production de spores est du type " sporogonie ". Généralement la production d'anastomoses est induite ou provoquée à distance, elle n'est donc pas le fait de mycéliums se rencontrant au hasard; il y a " télémorphose " qui suivant les cas a une signification apparente toute différente : intervention dans les phénomènes de sexualité, formations parasitaires des champignons prédateurs (DRECHSLER, COMANDON et de FONBRUNE), etc.... Nous n'avons pas fait d'expériences à ce sujet qui trouverait sa place aussitôt après une étude de la progression centrifuge du cytoplasme; nous observons toutefois une plus grande production d'anastomoses banales sur des milieux qui se dessèchent et dans les cultures en couche mince.

3 . Le bourgeonnement .

Typiquement les champignons filamenteux ne se multiplient pas par bourgeonnement avec cellules finalement séparées les unes des autres, mais nous rencontrons cet aspect de développement dans des conditions expérimentales et son intérêt réside dans le " phénomène de réduction morphologique avec éléments dissociés et monomorphes " qu'il représente. Ainsi TORULA DEMATIA et trois autres souches de " levures noires " que nous avons étudiées peuvent donner un état levuriforme pur avec éléments dissociés ayant la taille et la forme de blastospores et qui se multiplient par bourgeonnement. Une sporophorée nouvelle, SPOROPHORA TORULIFORMIS, s'est d'abord présentée à nous sous la forme de cellules isolées, fusiformes et bourgeonnantes à tel point que nous pensions avoir affaire à une levure; au bout de plusieurs repiquages il y a formation de mycélium avec de petits sporophores producteurs de conidies qui à leur tour se multiplient par bourgeonnement en plusieurs assises; les éléments levuriformes observés au début ont la même structure que ces conidies et nous avons là un cas de "conidies-levures".

PULLULARIA PULLULANS, sous sa forme DEMATIUM, est caractérisé par un développement mycélien plus ou moins important et la production abondante de conidies. Il y a dualité mycélienne : d'une part un mycélium gros, irrégulier, moniliforme,

dont les parois s'épaississent et se pigmentent à mesure qu'il vieillit, dont certains éléments se transforment en chlamydospores; d'autre part un mycélium grêle, régulier, riche en cytoplasme, à paroi mince, naissant de ce gros mycélium. Les conidies s'insèrent sur le mycélium à la manière de radulaspores, les " radula " étant, à notre avis, des sporophores rudimentaires avec lesquels nous trouvons des formes de transition; les conidies sont disposées en manchon ou en verticille glomérulaire à l'apex de chaque élément mycélien; de plus ces conidies ellipsoïdales, à paroi mince et non pigmentée, peuvent bourgeonner en conidies secondaires. BERLESE (1895) et PLANCHON (1900) avaient déjà reconnu un état levuriforme de PULLULARIA PULLULANS, différent de l'état DEMATIUM qui vient d'être décrit : les " formes-levures " (gemmations) sont simplement des conidies qui bourgeonnent, mais qui peuvent, à tout moment aussi, germer en un mycélium; cet état de " réduction morphologique " est comparable au cas de " conidies-levures " observé chez SPOROPHORA TORULIFORMIS. Il y a lieu de distinguer, chez PULLULARIA PULLULANS, cet état levuriforme d'un autre qui consiste en la fragmentation de filaments mycéliens, forme pratiquement arthrosporee que nous rencontrons dans des conditions défavorables, notamment au cours d'états kystiques, mais autrement aussi.

4 . La scissiparité .

Nous l'avons étudiée dans le cas de GEOTRICHUM CANDIDUM dont le mycélium, à mesure qu'il s'étend, se résoud en arthrospores dont chacune s'accroît indépendamment, d'où la disposition en zig-zag observée avec les cultures sur lame; chez ce champignon dont la forme est remarquablement fixe la croissance intercalaire s'ajoute donc à la croissance terminale. Les arthrospores se forment par fragmentation du cytoplasme en masses que nous avons reconnues être polynucléées et non par étranglement d'éléments mycéliens communiquant par des plasmodesmes; chaque fragment s'entoure ensuite d'une membrane propre.

5 . La reproduction par conidies .

La reproduction par conidies se fait par l'intermédiaire d'un appareil spécialisé (sporophore, phialide). Lorsqu'il se développe sur le mycélium transverse, celui-ci achève de se vider de son cytoplasme à son profit, mais, en même temps, apparaît, au sommet du sporophore ou de la phialide, un processus cytoplasmique régulateur de la formation des conidies; MASON (1933) le compare à un

processus méristématique et propose le nom de spores méristématiques pour les phialospores .

6 . La formation de spores aux dépens du thalle végétatif .

C'est le cas de champignons thallosporés (VUILLEMIN) filamenteux dont nous trouvons un exemple typique avec *TORULA DEMATIA* et nos levures noires qui présentent les caractères suivants :

- disposition ramifiée du mycélium à la manière du pseudo-mycélium arborescent des levures .
- absence d'anastomoses
- différenciation de l'extrémité distale des filaments mycéliens en thallospores disposées en chaînettes et ayant la taille, la forme de blastospores .

Ces champignons, appelés *TORULA*, sont souvent considérés comme étant des levures; il y a en effet un état levuriforme pur, mais il n'est pas constitué par des blastospores, mais par des spores véritables bourgeonnantes; il représente un état de réduction morphologique banal de ces champignons filamenteux à cellules mycéliennes uninucléées et qui présentent des plasmodesmes. Nous constatons que leur type de développement est similaire à celui des *HORMODENDRON* dont les extrémités distales des filaments mycéliens aériens se différencient, non plus en éléments à apparence de blastospores, mais en éléments à apparence de conidies, caduques comme celles-ci. C'est la seule différence fondamentale entre ces deux types de champignons et ceci montre suffisamment qu'à travers les phénomènes de convergence morphologique réalisant des " facies " différents (ici de levure et de conidiosporé) il faut rechercher la nature véritable du champignon .

Une autre forme de thallospores sont les aleuries, éléments sphériques à paroi épaisse et colorable par le bleu coton, à cytoplasme dense dont les affinités tinctoriales sont généralement celles que nous avons trouvées déjà pour les chlamydospores; aussi peut-on les considérer comme de véritables chlamydospores aériennes et chez certaines espèces (par exemple *SEPEDONIUM CHRYSOSPERMUM*) nous trouvons un balancement entre les deux formations suivant les conditions de culture; les aleuries sont cependant souvent plus différenciées et leur disposition est assez souvent ordonnée, par exemple en cyme scorpioïde unipare chez *ALEURISMA LUGDUNENSE*. Que les aleuries soient sessiles ou pédiculées, on remarque très nettement, lors de leur formation, que le mycélium se vide de son cytoplasme à leur profit.

Il y a production de chlamydospores chez nombre de champignons filamenteux. Nous observons ce qui suit chez PULLULARIA PULLULANS lorsque nous provoquons son développement immergé : à mesure que le mycélium s'étend et que le cytoplasme progresse à son extrémité distale, il y a une masse de plus en plus importante de tubes mycéliens à paroi épaisse et pigmentée, mais qui sont vides de cytoplasme; les traces du passage de celui-ci persistent sous la forme de chlamydospores plus ou moins abondantes, intercalaires, isolées ou se suivant, à paroi très épaisse et très pigmentée, emprisonnant un cytoplasme avec un globule lipidique. Lorsque les conditions sont favorables ces chlamydospores germent par déhiscence de leur paroi et le cytoplasme s'en échappe comme s'il;était antérieurement sous pression; il se développe ensuite un des états DEMATIUM, mycélien, levuriforme, etc....

Les thallospores des levures noires et des HORMODENDRON peuvent aussi se transformer en chlamydospores.

7 . Formations adventices .

Les cultures sur lame ou en couche mince étendue, le dessèchement progressif du milieu font apparaître, même chez des champignons non parasites, des formations adventices sous forme de boules, de digitations palmées (SPOROPHORA, etc...).

8 . Résumé .

La comparaison de levures et de champignons filamenteux nous permet de souligner les différences suivantes :

- absence de spores véritables (en dehors des asco- et des chlamydospores) chez les levures blastosporées; les ENDOMYCOPSIS et les TRICHOSPORON sont déjà de véritables champignons filamenteux.

- il n'y a pas de production d'antostomoses chez les levures ni chez certains champignons filamenteux tels que les Dématiées levuriformes.

- il y a une diversité et une différenciation morphologique beaucoup plus importantes chez les champignons filamenteux; alors que cette dernière s'étend de l'état blastospore à l'état pseudo-mycélien chez les levures blastosporées, elle s'étend d'états de réduction morphologique à éléments dissociés jusqu'à ceux de champignons filamenteux avec mycelium transverse, appareil sporifère et phénomènes complexes de reproduction parfaite.chez les derniers.

Tout en constatant ces différences, on trouve un terme de passage par les

Dématiées levuriformes et on trouve une convergence levuriforme de divers champignons filamenteux.

Il y a surtout de grandes analogies entre les deux groupes par

- le mode commun de croissance terminale liée à la progression centrifuge du cytoplasme
- les phénomènes d'élongation membranaire responsables de l'extension souvent importante prise par un champignon
- la formation de spores de conservation

Nous insistons particulièrement sur le processus de progression centrifuge du cytoplasme, terme qui nous paraît mieux convenir que celui de " migration du cytoplasme " généralement adopté depuis les travaux de BULLER; le terme de migration fait penser qu'il y a translation en masse du cytoplasme, ce qui n'est pas exact, car d'une part il peut y avoir accroissement du cytoplasme en état permanent de synthèse et de remaniement, d'autre part du cytoplasme peut persister dans les éléments mycéliens ou pseudo-mycéliens en amont; on doit donc, comme nous avons pensé à le faire, examiner ce processus par rapport aux courants cytoplasmiques (courants anastomotiques par exemple) et par rapport aux phénomènes qui lui font suite (élongation, formation de chlamydospores, etc...).

COMMENTAIRE DES DESSINS ;

PLANCHE I

1 . HANSENULA ELLIPSOIDOSPORA .

Aspect de bourgeonnement banal; souvent le noyau ne s'engage dans le bourgeon que lorsque celui-ci est près de se détacher.

2 . SACCHAROMYCODES LUDWIGII (souche asporogène).

Bourgeonnement par une base large, quelquefois bipolaire comme chez les NADSONIA. (Levure diploïde et hétérozygote, GUILLIERMOND, WINGE et LAUSTSEN).

3 . RUBROBACTERIOPSIS RUGOSA .

Bourgeonnement se produisant en n'importe quel point de la surface cellulaire; le bourgeonnement profond simule la scissiparité. Colonies épaisses, membraneuses.

4 . ENDOMYCOPSIS CAPSULARIS (souche BAARN).

C'est une " levure mycélienne " dont le mycélium forme des spores véritables, mais directement sans l'intermédiaire d'un sporophore.

5 . TRICHOSPORON sp (GEOTRICHOIDES)

Chez les TRICHOSPORON, homologues anascosporés des ENDOMYCOPSIS, les spores naissent du mycélium par un processus rappelant le bourgeonnement profond. Le mycélium se désarticule en arthrospores.

6 . Un autre TRICHOSPORON .

On constate nettement la désarticulation du mycélium.

7 . USTILAGO sp..

Bourgeonnement par une base large aboutissant soit à des éléments dissociés à la manière de blastospores (a), soit à des filaments où les cellules restent liées par des communications cytoplasmiques (c); il s'agit donc d'un champignon filamenteux présentant un état de convergence levuriforme; certains de ces USTILAGO donnent en culture sur lame des chlamydospores (c) qui germent en un mycélium.

8 . SCHIZOSACCHAROMYCES OCTOSPORUS .

Le mycélium se divise à mesure de sa formation par clivage oblique, d'où la croissance en épaisseur.

9 . NOCARDIA ASTEROIDES .

Cet organisme à la frontière des bactéries et des champignons présente une croissance nettement centrifuge, mais aussi une croissance " angulaire " (ØRSKOV).
par désarticulation de son mycélium.

10 . ASPECTS DE LA FILAMENTISATION DE LEVURES .

(demi-schématique d'après les aspects du développement en culture sur lame de nombreuses levures). La " progression centrifuge du cytoplasme " et " l'élongation cellulaire " jouent un rôle fondamental dans la genèse de ces aspects qui, dans leur état définitif, ont été décrits par LANGERON et TALICE; en réalité une même levure peut présenter plusieurs de ces aspects; enfin ceux-ci sont rarement purs et on observe le plus souvent des états intermédiaires ou intriqués.

- type (a) MYCOTORULA : verticilles de blastospores à l'apex de chaque élément pseudo-mycélien dont on sait qu'ils sont des blastospores élongées; ces blastospores sont formées par polybourgeonnement distal des éléments pseudo-mycéliens.

- type (b) MYCOTORULOIDES : les verticilles sont composés ou mixtes, car ils comprennent aussi des rameaux reproduisant le rameau primitif; ces rameaux secondaires font un angle de 60° avec le rameau primitif; ils sont régulièrement étagés comme dans le type MYCOTORULA proportionnellement à l'élongation des éléments pseudo-mycéliens du rameau mère, élongation d'autant plus prononcée que plus proximale.

- type (c) : aspect voisin du précédent, mais verticilles pauvres, car le polybourgeonnement distal se réduit à la formation de 2 ou 3 blastospores qui se développent en rameaux pseudo-mycéliens reproduisant le rameau mère; cet aspect est relativement fréquent.

- type (d) : type BLASTODENDRION avec angle très fermé de ramification.

- type (e) : CANDIDA : chaînettes de blastospores, soit terminales, soit latérales naissant notamment par bourgeonnement latéral d'éléments pseudo-mycéliens (bourgeons latéraux appelés pseudo-conidies); en conséquence, les rameaux ne sont plus régulièrement espacés.

PLANCHE 2

1 . SACCHAROMYCES CEREVISIAE.

Aspect, rare, de conjugaison de deux cellules haploïdes.

2 . ZYGOSACCHAROMYCES PRIORIANUS . Classé actuellement comme SACCHAROMYCES CEREVISIAE

Nous continuons, comme WINGE et LAUSTSEN, à le considérer comme une espèce distincte. Nous remarquons l'absence de filamentisation et l'abondance des images de conjugaison par rapport aux souches habituelles de SACCHAROMYCES CEREVISIAE .

3 . SACCHAROMYCODES LUDWIGII .

Aspects de conjugaison, mais n'aboutissant pas chez cette souche d'ailleurs peu

vigoureuse, à la production d'ascospores.

4 . SACCHAROMYCES ACIDIFACIENS (repiquage de la souche originale de NICKERSON)

Les processus de conjugaison succèdent aussitôt à la progression centrifuge du cytoplasme au niveau des éléments pseudo-mycéliens (coefficient d'élongation 2,2) (f et g). On trouve tous les aspects intermédiaires entre la conjugaison typique par tubes entre cellules indépendantes et la conjugaison atypique, notamment entre une cellule et son produit de bourgeonnement (voir e, puis f, g, h, i). Notons que dans la parthénogénèse vraie, il y a des tentatives de conjugaison, comme GUILLIERMOND en a reconnu chez les DEBARYOMYCES. La conjugaison est suivie immédiatement de la production d'asques. En (a, b, c), aspects du noyau correspondant aux phénomènes de conjugaison. En h, aspect de conjugaison double observé seulement au niveau du pseudo-mycélium.

PLANCHE 3

1 . PICHIA ASCOFILAMENTOSA n. sp..

Cette espèce ne diffère de PICHIA FARINOSA que parce qu'elle est strictement azymatique. Comme dans le cas de SACCHAROMYCES ACIDIFACIENS, conversion d'éléments pseudo-mycéliens en asques succédant à la progression centrifuge du cytoplasme (coefficient d'élongation 3).

2 . HANSENULA ELLIPSOIDOSPORA n. sp..

Cette espèce ne diffère de HANSENULA ANOMALA que par la forme ellipsoïdale des ascospores. Il y a aussi production d'asques au niveau d'éléments pseudo-mycéliens consécutive à la progression centrifuge du cytoplasme. Pas de phénomènes de conjugaison typique précédant la formation des asques.

3 . SPOROPHORA TORULIFORMIS n. sp..

Champignon trouvé à l'état levuriforme (a) dans une solution de produit chimique sans azote, état qui se maintient aux premiers repiquages. L'état filamenteux se caractérise par un mycélium cloisonné qui se vide de son cytoplasme au profit de petits sporophores produisant des conidies fusiformes qui bourgeonnent en conidies secondaires en plusieurs assises successives (b et c). La progression centrifuge du cytoplasme ne devient apparente qu'à l'état filamenteux. En d, digitations palmées observées dans une zone déshydratée.

4 . ACREMONIUM .

Souche isolée dans des conditions analogues. Le sporophore est typique et il n'y a qu'une assise de conidies.

5 . CHAMPIGNON A DICTYOSPORES .

Comme le montrent les figures, les spores sont similaires à celles d'ALTERNARIA, mais chez cette espèce dont nous n'avons pas trouvé la dénomination, que nous avons trouvée sur une pourriture de fruit, les dityospires ne sont pas pigmentées. Leur formation, comme chez les ALTERNARIA, peut être intercalaire dans un mycélium. Ces spores sont donc des thallospires.

6 . PHIALOPHORA VERRUCOSA .

Culture sur lame de ce champignon, 1^{er} parasite grave de l'homme, appartenant à un genre particulièrement étudié par MELIN et NANNFELDT ainsi que le genre voisin CADOPHORA. Phialides s'insérant directement sur le mycélium qui se vide de son cytoplasme à leur profit; le cytoplasme se trouve finalement au haut du ventre de la phialide à son union avec la collerette. Les phialospores sont englobées dans une masse mucilagineuse et ont le caractère de myxospores. Ce champignon présente un état de réduction morphologique importante en corpuscules épais à parois épaisses et pigmentées, se multipliant par scissiparité, ce qui leur confère souvent un aspect cloisonné; la progression centrifuge du cytoplasme si nette dans la forme de champignon filamenteux, n'apparaît pas au cours de l'état de réduction morphologique parasitaire (voir notamment CONANT 1945).

PLANCHE 4

ANASTOMOSES .

En 1, un aspect inédit d'anastomoses entre des mégaspores de FUSARIUM GERMANT.

En 2, 4 et 5, anastomoses scalariformes.

En 3, anastomoses d'un mycélium à lui même.

En 6, les anastomoses concourent à la formation d'une pycnide chez une Pseudo-sphaeriale.

Toutes ces anastomoses se produisent en amont de la zone du thalle où il y a progression centrifuge du cytoplasme.

PLANCHE 5

I . TORULA DEMATIA .

Chez ce champignon filamenteux thallosporé, nous pouvons obtenir soit un état levuriforme pur, soit un développement rappelant celui de l'appareil pseudo-mycélien d'une levure d'autant plus qu'il n'y a pas d'anastomoses et que la formation des spores rappelle celle de blastospores (convergences levuriforme et filamenteuse).

2 . HYALODENDRON (a) et HORMODENDRON (b).

Chez ce champignon filamenteux thallosporé, il y a formation de hyphes aériens (rares chez *TORULA DEMATIA* et pratiquement absents chez les " levures noires ") avec " convergence conidiforme "; mais il ne s'agit pas de champignons producteurs de conidies et nos observations confirment celles de MASON et de LANGERON : il s'agit de thallospores, " en effet, la chaîne articulée ne peut se former que si une première spore reste attachée à la facette d'insertion du sommet du filament, à cette première spore une seconde et ainsi de suite, la chaîne se formant par croissance basifuge. Les premières spores qui sont à la base de la chaîne se comportent comme une portion de thalle puisqu'elles servent à la fois de support et de canal nourricier aux autres spores qui naissent au fur et à mesure. Toutes sont les unes pour les autres une portion du thalle, puisque les plus jeunes sont apicales et distales. Ce sont donc de toute évidence des thallospores..." (LANGERON 1944). En effet, comme l'ont fait remarquer MASON, puis LANGERON, ces chaînes de thallospores paraissent bien ^{/ se former} par croissance basifuge, mais ici encore il y a lieu de distinguer les apparences d'un état final et la constitution de ces états; à notre avis et d'après nos observations morphologiques appuyées de l'emploi de colorants cytoplasmiques, il y a lieu de décomposer les processus observés : il y a d'abord progression centrifuge du cytoplasme, puis quand la croissance est arrêtée et sous l'influence de l'air, il y a différenciation morphologique basipète et nous trouvons constamment que les spores les plus différenciées sont périphériques, celles qui paraissent les plus jeunes sont les plus proximales, ce qui crée une " apparence de croissance basifuge ". Cette conception nouvelle s'étend non seulement aux genres *HORMODENDRON* et *HYALODENDRON*, mais aux levures noires. Il y a donc lieu, au cours d'une étude de la formation des spores, de distinguer les phénomènes de croissance et d'extension où la " progression centrifuge du cytoplasme " joue un rôle si important et les phénomènes de différenciation du mycélium aérien quand il s'agit de champignons thallosporés.

3 . HORMODENDRON sp

Une partie du mycélium ou les thallospores peuvent se convertir en chlamydospores, cette évolution commune soulignant la nature " mycélienne " des thallospores; nous ne connaissons pas de cas semblables de transformation de conidies.

4 . " Une levure noire ".

Thallospores converties en chlamydospores.

5 . Un champignon du sol, que nous n'avons pu classer, formant des aleuries et des chlamydospores, ce qui souligne l'analogie de ces formations, les aleuries étant des chlamydospores aériennes.

6 . ALEURISMA LUGDUNENSE .

Disposition d'aleuries en cyme scorpioïde unipare.

7 . PULLULARIA PULLULANS .

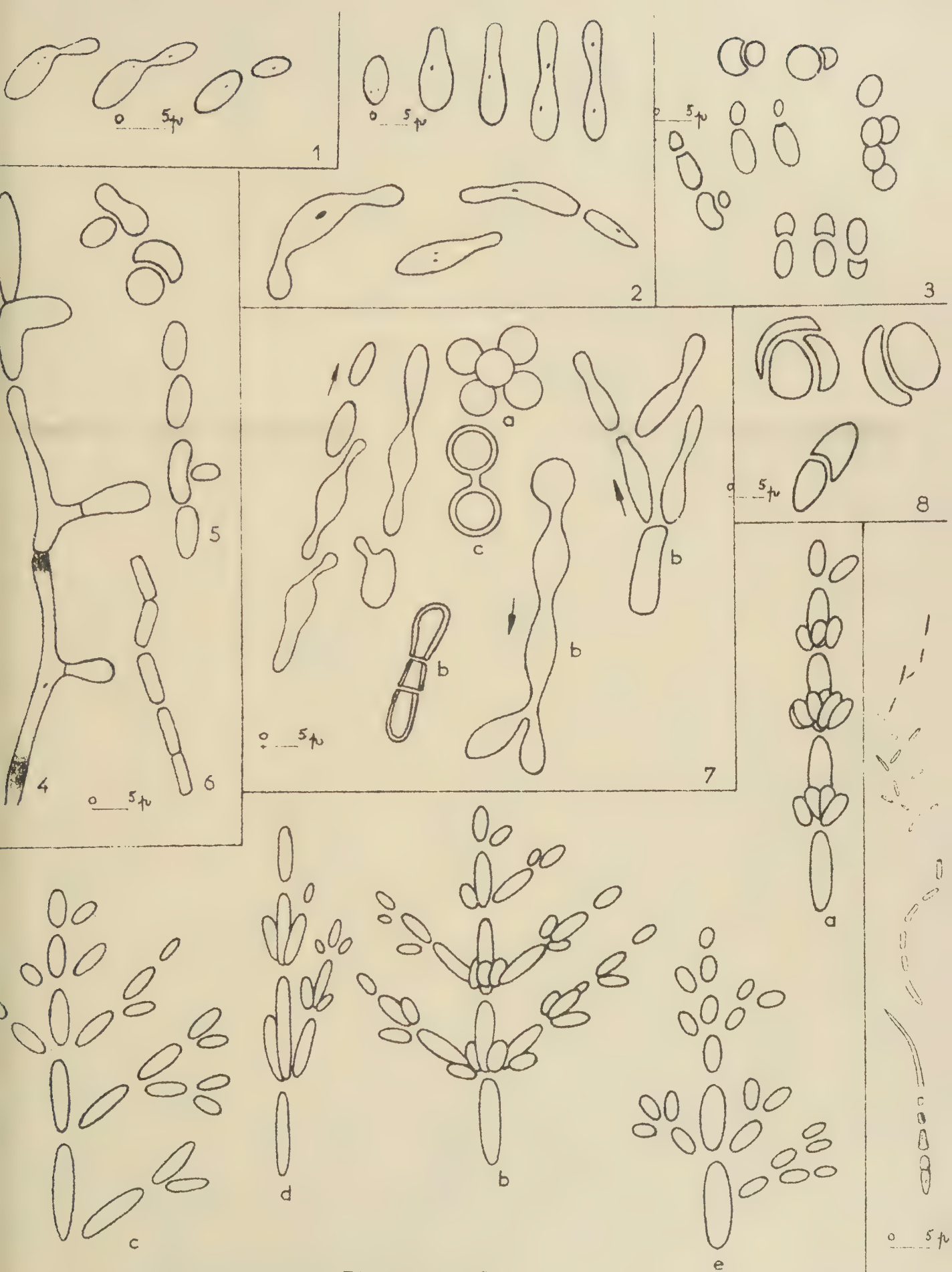
- en (a), des aspects levuriformes par bourgeonnement de conidies.
- en (b), des aspects de l'état arthrosporé en courtes chaînettes .
- en (c), fragmentation d'un mycélium prenant l'aspect arthrosporé.

PLANCHE 6 (PULLULARIA PULLULANS)

En (a, b, c, d, e), on constate l'hétérogénéité de la forme DEMATIUM :

- le mycélium : tantôt gros, irrégulier, à parois épaisses et pigmentées à mesure du vieillissement, pouvant être le siège de chlamydosporulation, tantôt fin, régulier, à parois minces, non pigmentées, naissant du gros mycélium

- les spores, non pigmentées, naissent soit de " radula "(a), soit de sporophores véritables (b) avec des intermédiaires entre ces deux formations. D'autres préparations montrent leur disposition éventuelle en verticilles glomérulaires à l'apex des éléments mycéliens ou en manchons de conidies. D'autres préparations encore, non figurées, montrent une prédominance de conidies bourgeonnantes. En (f, g), " thalles fumagoïdes " par transformation des éléments mycéliens en chlamydospores, lorsqu'ils ont cessé d'être le siège de la progression centrifuge du cytoplasme.



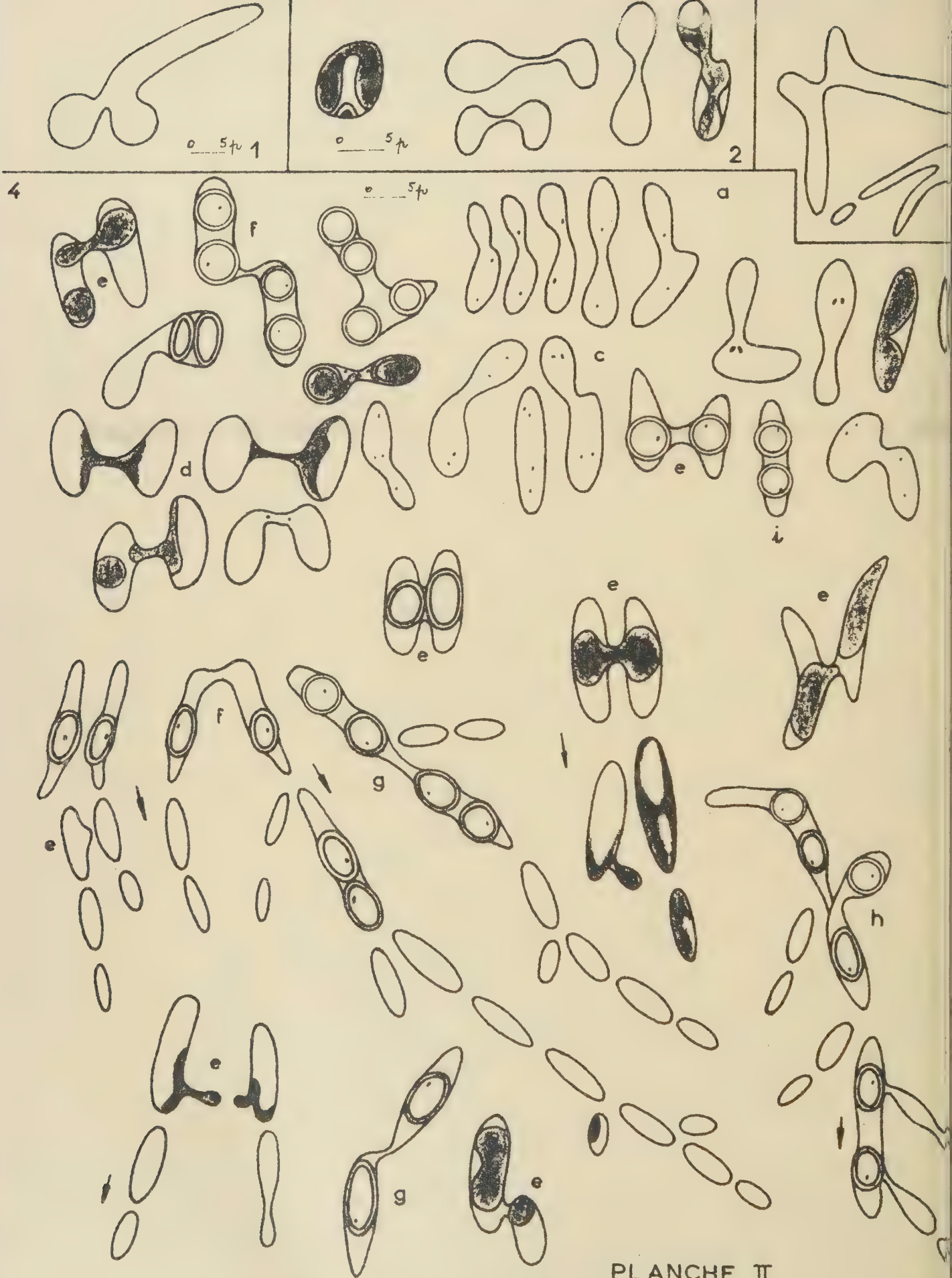


PLANCHE II

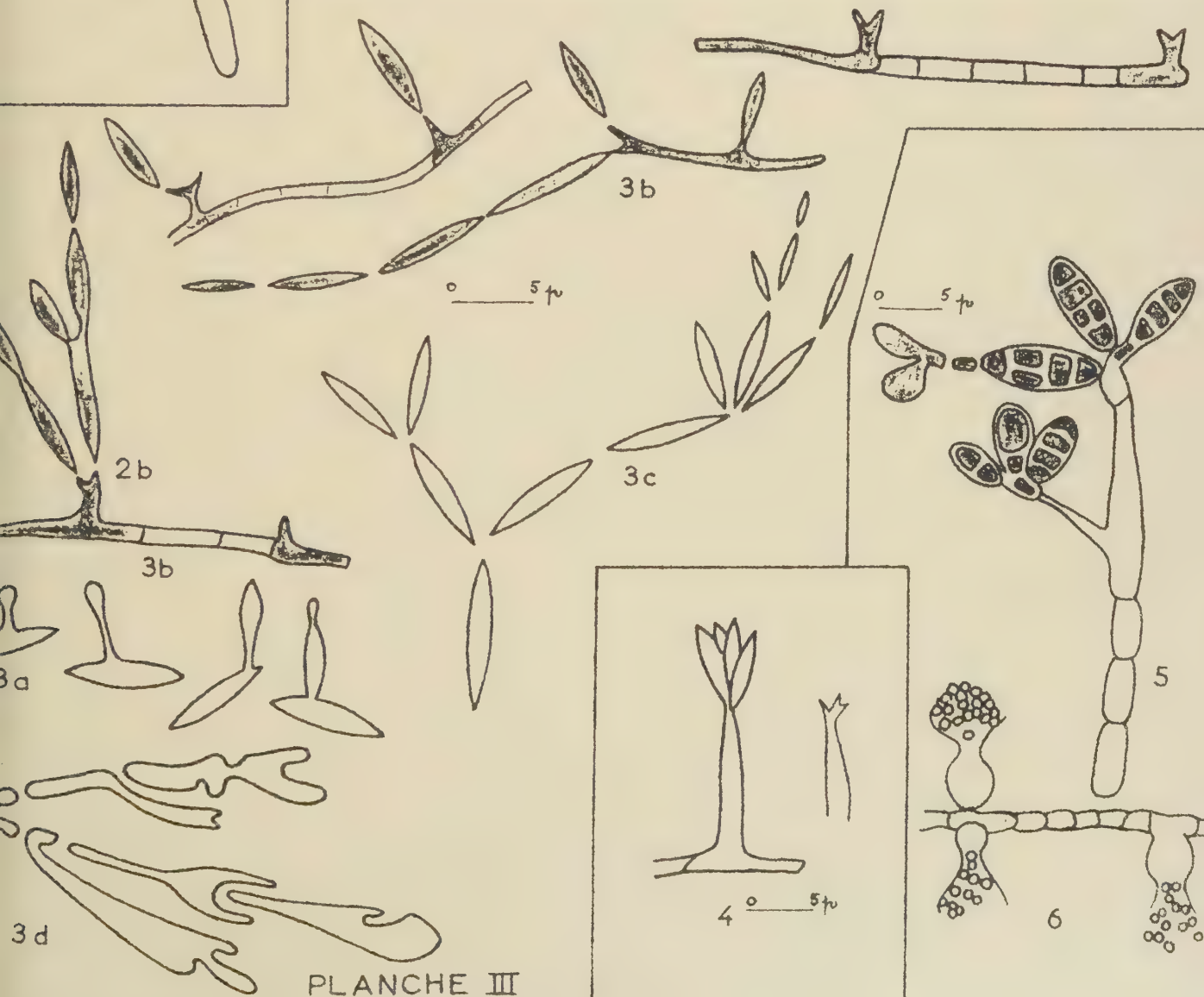
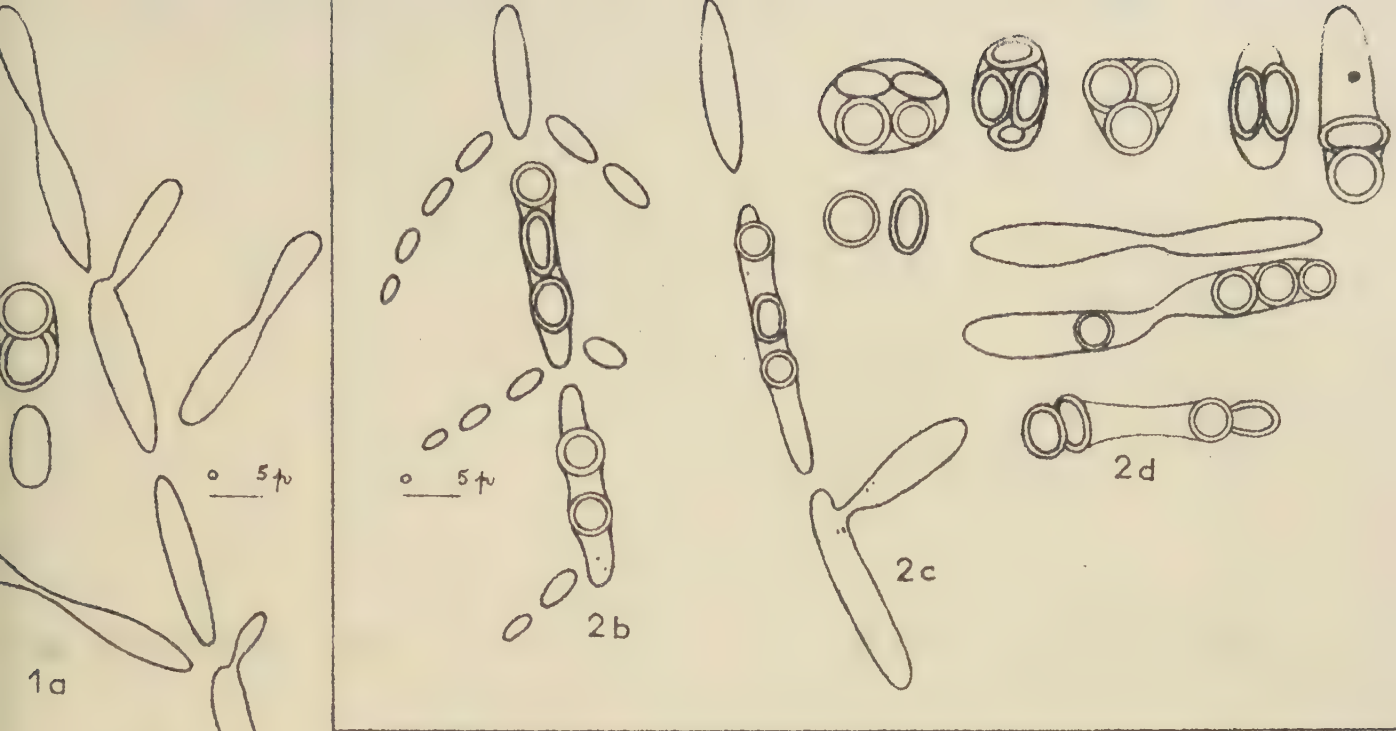
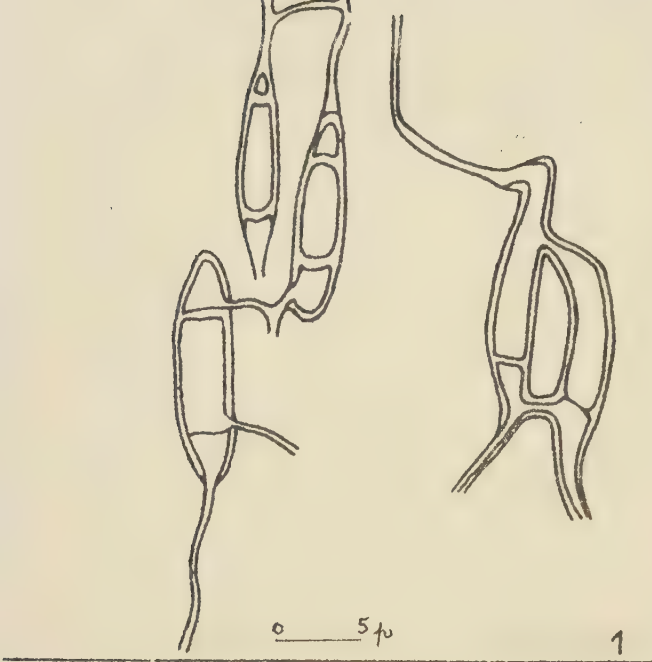
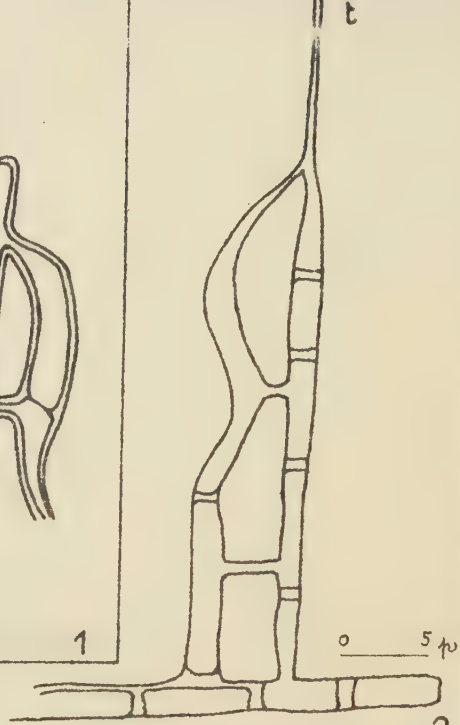


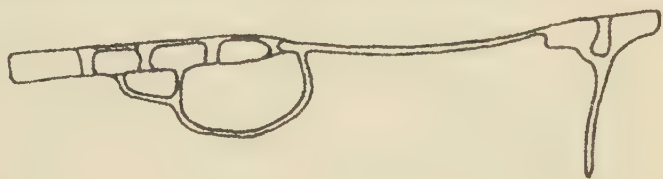
PLANCHE III



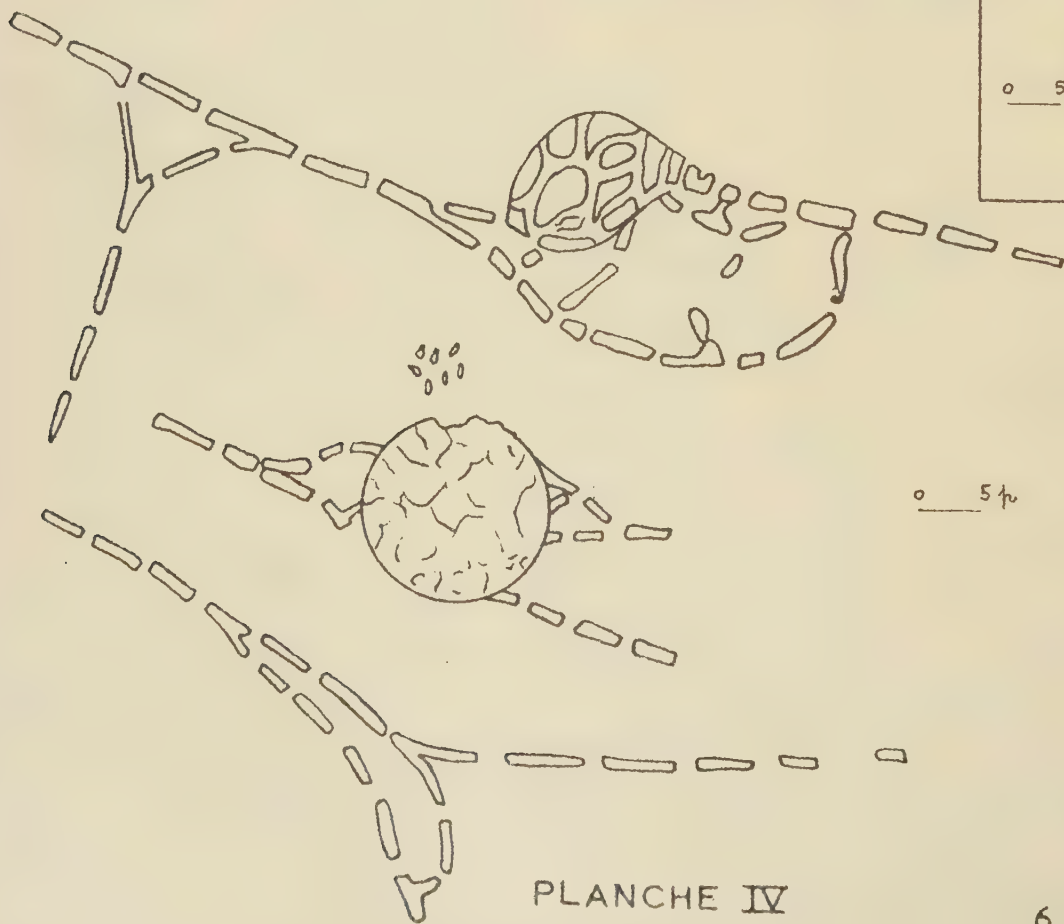
1



2

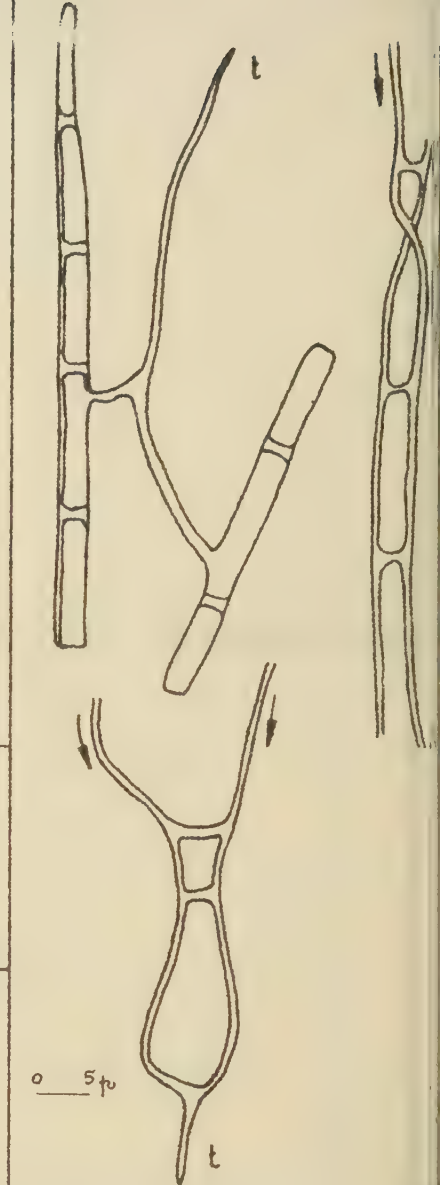


3



5 μ

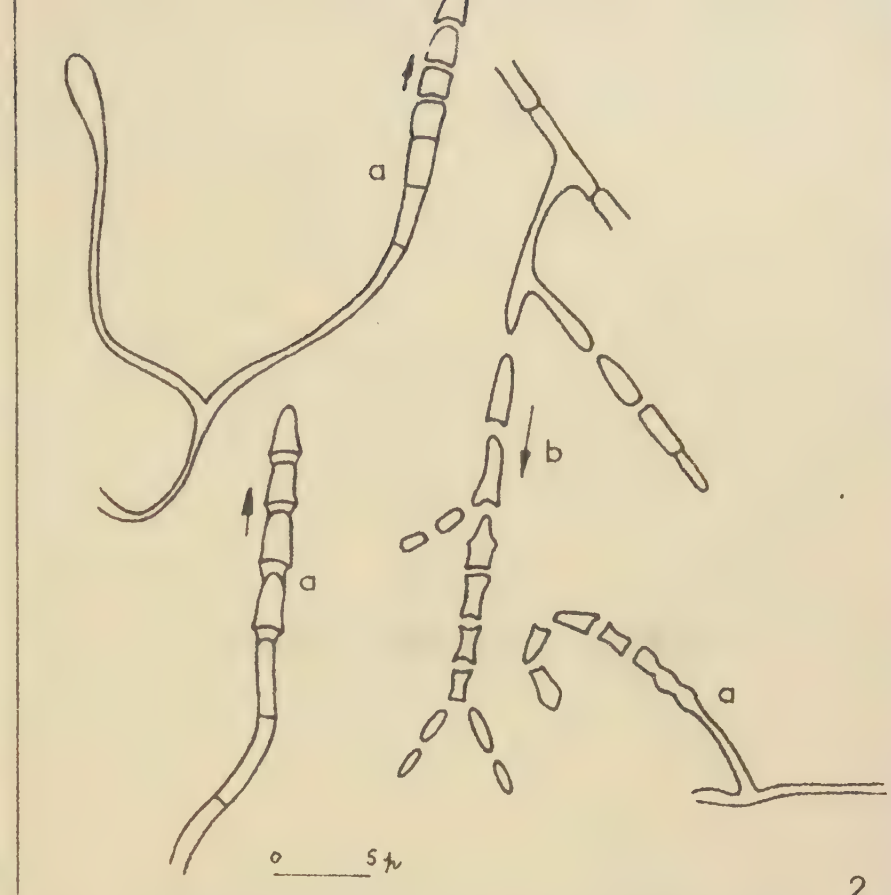
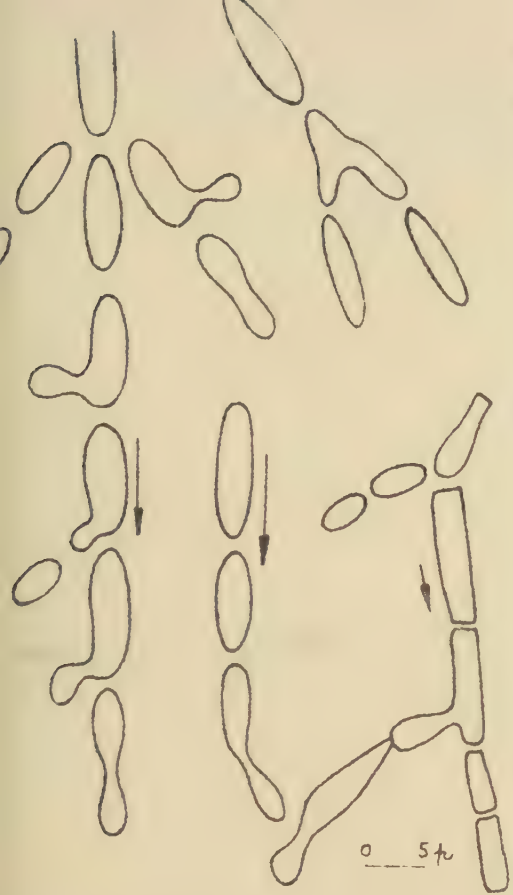
PLANCHE IV



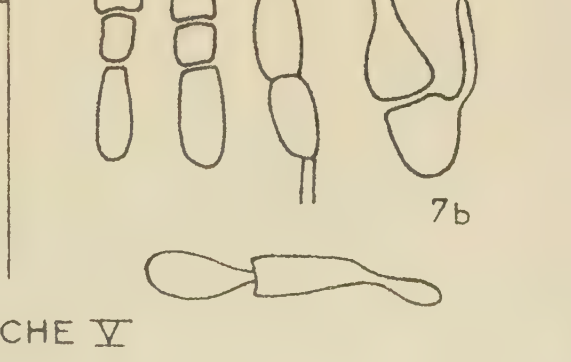
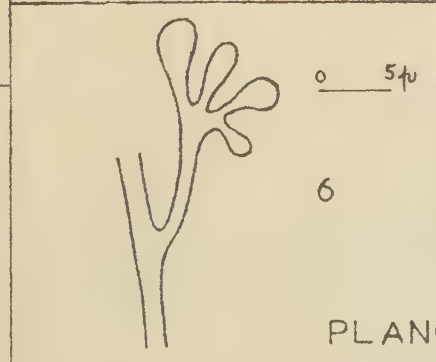
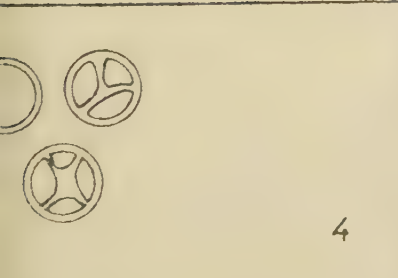
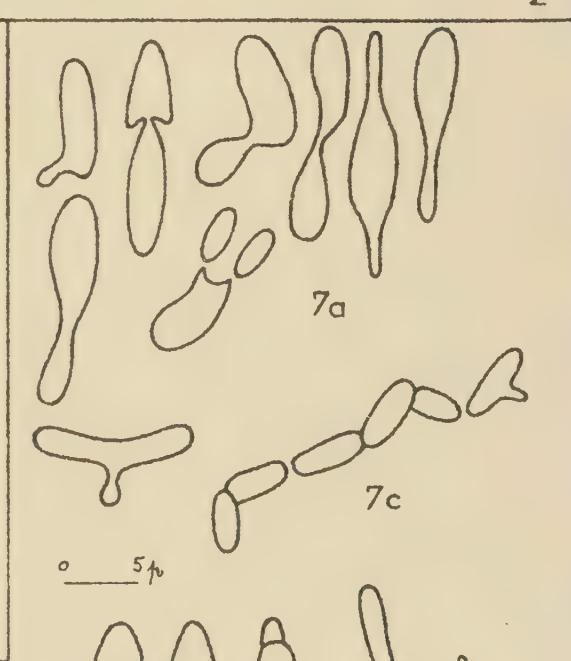
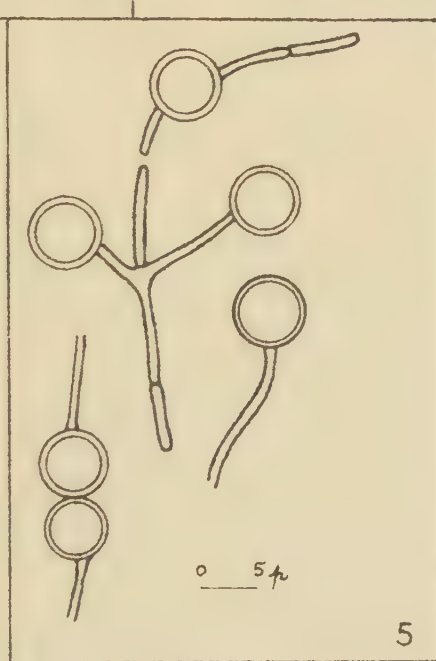
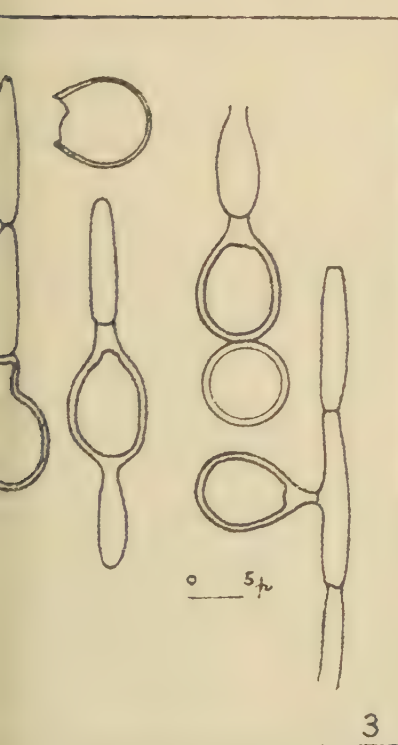
5 μ



6



2



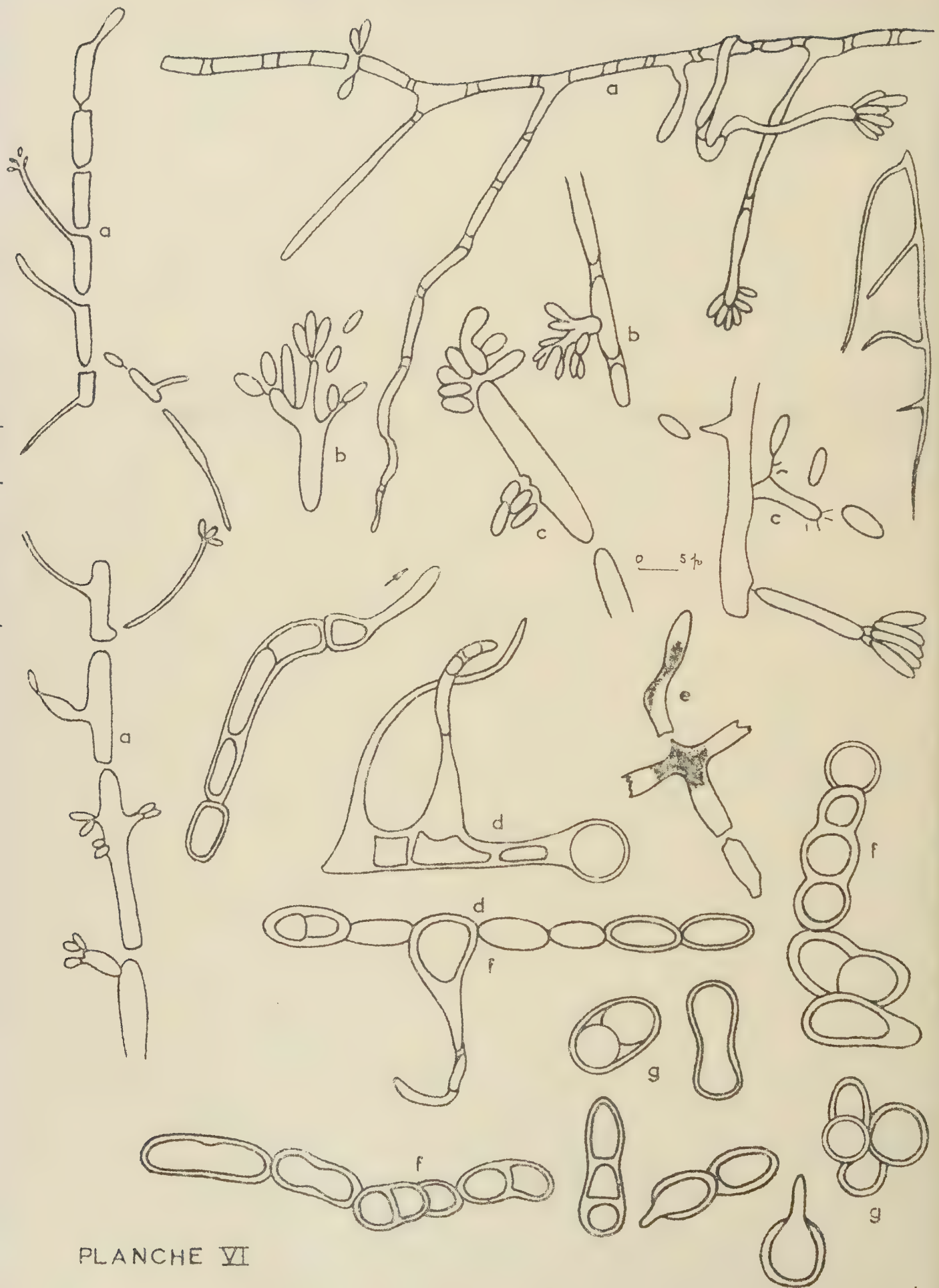


PLANCHE VI

COMMENTAIRE DES CLICHES

REPLICATION CELLULAIRE CHEZ LES LEVURES.

DOTORULA RUBRA

Blastospores allongées et ovalaires dont on voit les aspects du bourgeonnement à différents stades; il est généralement subapical. Les chaînettes de blastospores, vivées les unes des autres par bourgeonnement, se disposent suivant un sens centrifuge. On ne voit pas de courant cytoplasmique dans les cellules jeunes bien qu'il existent; ils sont visibles dans les cellules âgées sous forme de fragmentation cytoplasmique.

ROBACTERIOPSIS RUGOSA

Les cellules sphéroïdales, épaisses, dérivent les unes des autres par un bourgeonnement siégeant en n'importe quel point de la surface; elles restent liées les unes aux autres; il n'y a pas d'élongation cellulaire. Il n'y a pas de tendance extensive, mais croissance en épaisseur. Le bourgeonnement profond simule la scissiparité.

CHOSPORON sp

Levure mycélienne qui forme des spores suivant un processus qui rappelle le bourgeonnement profond et le bourgeonnement par une base large. Le mycélium tend à se désarticuler en arthrospores.

GRESSION CENTRIFUGE DU CYTOPLASME.

DIDA KRUSEI

Tendance extensive en surface avec filamentisation très précoce. Il y a en fait une élongation précoce et rapide des blastospores ovalaires en éléments pseudo-mycéliens (coefficient d'élongation : 4). Ce pseudo-mycélium a une ramification régulièrement espacée, du type opposé avec prédominance d'un côté, étalée, et les rameaux forment un angle de 60° avec le rameau mère. Ils lui sont similaires. Le polybourgeonnement distal fait penser à un processus méristématique limité à l'extrémité des éléments élongés; il est limité ici à la production de 3 bourgeons successifs. On remarque que le cytoplasme est dense dans les blastospores périphériques, moins abondant dans celles qui commencent à s'élonger, et quasiment presque disparu des éléments pseudo-mycéliens les plus âgés. Les indices de courants cytoplasmiques, non décelables sur les blastospores, sont décelables en suite de la diminution de la densité cytoplasmique, sous forme de cytoplasme apical uni par des travées, dans les éléments s'élongeant.

DIDA LIPOLYTICA

Tendance extensive en surface avec filamentisation très précoce. Il y a en fait une élongation précoce et rapide des blastospores en éléments pseudo-mycéliens (coefficient d'élongation : 6). Ce pseudo-mycélium n'a pas une ramification régulièrement espacée et disposée. L'aspect se rapproche déjà beaucoup des champignons filamenteux en raison de la constitution secondaire de cloisons intercellulaires, mais il n'y a pas de plasmodesmes. Le polybourgeonnement distal est limité à la production de 2 bourgeons successifs; les éléments pseudo-mycéliens peuvent bourgeonner latéralement, bourgeons (pseudo-conidies de LANGERON) qui sont à l'origine

de nouveaux rameaux. Le cytoplasme est dense à la périphérie et devient rapidement rare au niveau des éléments pseudo-mycéliens; il persiste plus ou moins longtemps en regard de leurs bourgeons latéraux.

CANDIDA HUMICOLA

Tendance extensive en surface avec filamentisation très précoce. Il y a en effet une élongation précoce et rapide des blastospores en éléments pseudo-mycéliens (coefficient d'élongation : 6. Ce pseudo-mycélium n'a pas une ramification régulièrement espacée et disposée; il a le type BLASTODENDRION et, ici, il est corémié. Le polybourgeonnement distal est limité à la production de 2 bourgeons successifs; par contre les rameaux pseudo-mycéliens se terminent par des chaînettes de blastospores. La progression centrifuge du cytoplasme est très accentuée, comme dans le cas des levures précédentes.

Un Monophialidé sp.

Ce champignon donne des colonies spongieuses, lisses, mais qui se hérissent plus tard de petites corémies sporifères. Les phialides sont simples, très allongées, donnant de petites phialospores rondes dont la plus distale est la plus âgée; les phialides s'insèrent directement sur le mycélium. On remarque la densité plus grande du cytoplasme à l'extrémité distale des mycéliums.

PROCESSUS DE CONJUGAISON ET ASCOSPORULATION.

Ascospores mises en évidence par des techniques récentes de coloration

Chez un SACCHAROMYCES, disposition longitudinale de 4 ascospores

Chez un DEBARYOMYCES, ascospores très petites, isolées ou par deux.

SCHIZOSACCHAROMYCES OCTOSPORUS

(également culture sur lame; coloration par l'érythrosine, puis bleu trypan)

Généralement 8 ascospores enserrées et empilées dans l'asque; on est frappé par l'importance de leur capsule.

PICHLIA FARINOSA.

Asques à 4 ascospores se formant dans les éléments pseudo-mycéliens en amont de la progression centrifuge du cytoplasme (culture sur lame). On remarque la filamentisation légèrement flexueuse, étalée, constituée d'éléments pseudo-mycéliens sans verticilles de blastospores.

HENSENULA ELLIPSOIDOSPORA

Conversion d'élément pseudo-mycélien en asques. Ascospores ellipsoïdales.

SACCHAROMYCES ACIDIFACIENS.

Conversion d'éléments pseudo-mycéliens en asques (seul cas d'observation chez les SACCHAROMYCES). On voit nettement les processus de conjugaison par tube précédant la formation des asques, d'où l'aspect fréquent d'asque biparti dont la formation suit immédiatement la conjugaison. La filamentisation est flexueuse et étalée sans verticilles de blastospores. La conjugaison suit immédiatement la progression centrifuge du cytoplasme, dans le temps et dans l'espace (cultures sur lame), et siège au niveau du cytoplasme résiduel. On trouve tous les intermédiaires entre la conjugaison typique et la parthénogénèse apparente. Les éléments pseudo-mycéliens sont uninucléés.

SCISSIPARITE CHEZ UN CHAMPIGNON FIL MENTEUX.

GEOTRICHUM CANDIDUM présente tant une croissance intercalaire par sa désarticulation en arthrospores qui continuent de s'accroître indépendamment qu'une tendance extensive. L'aspect en zig-zag du mycélium est typique.

La technique de FEULGEN-KOSSENBECK, appliquée en culture sur lame, montre des noyaux multiples dispersés dans le cytoplasme et à différents stades. Cette même technique en culture sur lame vient de nous montrer que les éléments pseudo-mycéliens sont uninucléés.

REPRODUCTION PAR CONIDIES.

SPIROPHORA TORULIFORMIS.

Le mycélium paraît vide de cytoplasme et celui-ci paraît se rassembler dans les sporophores courts producteurs de conidies qui bourgeonnent en plusieurs assises

PHIALOPHORA VERRUCOSA.

Le mycélium paraît vide de cytoplasme et celui-ci paraît se rassembler à l'extrémité de la phialide à son union avec la collerette : à la progression centrifuge du cytoplasme succède un processus cytoplasmique régulateur de production de conidies (phialospores qui sont des myxospores)

HEMISPOREA STELLATA

Phialides longues à collerette très allongée. Les hémispores sont des phialospores d'un type très particulier qui se divisent par étranglement. Le fond mycélien apparaît plus ou moins vide de cytoplasme.

FORMATION DE SPORES AUX DEPENS DU THALLE VEGETATIF

LEVURES NOIRES.

Il n'y a ni appareil sporifère, ni anastomoses ; çà et là, on remarque des plasmodesmes.

Chez *TORULA DEMATIA*, on remarque l'aspect raquettiforme du mycélium ; les éléments raquettiformes sont généralement bicellulaires avec un noyau dans chaque cellule.

On remarque les très longues chaînes de thallospores à aspect de blastospores chez certaines de ces levures noires.

HORMODENDRON sp

Les thallospores caduques, conidiformes, se forment par différenciation des filaments mycéliens aériens.

FORMATION D'ALEURIES ET DE CHLAMYDOSPORES.

CANDIDA ALBICANS

Blastospores arrondies avec élongation facile en éléments pseudo-mycéliens (coefficient d'élongation : 5). Polybourgeonnement distal important aboutissant à des vericilles glomérulaires à l'apex des éléments pseudo-mycéliens. Il y a aussi formation de chaînettes de blastospores à partir de bourgeons latéraux ; aussi n'y a-t-il pas d'aspect verticillé régulier. Certains filaments sont porteurs de c l

chlamydospores, ici terminales, latérales avec d'autres souches.

USTILAGO sp

Culture sur lame où on trouve, par plages, des chlamydospores qui sont fortement acidophiles (comme les ascospores); certaines germent en un mycélium; c'est le maximum que nous ayons pu obtenir au point de vue du développement saprophytique de ces organismes.

Un aleuriospore pédicellé

On voit encore l'absence apparente de cytoplasme dans le mycélium qui contraste avec son importance dans les aleuries que d'aucuns considèrent comme étant l'équivalent de chlamydospores.

PULLULARIA PULLULANS

Ici la forme *DEMATIUM* avec développement mycélien abondant et conidies.

On remarque la dualité mycélienne et l'existence de plasmodesmes. Certains éléments du gros mycélium acquièrent une paroi plus épaisse encore et pigmentée; ils se transforment en chlamydospores.

On remarque quelques colonies ellipsoïdales.



RUBROBACTERIOPSIS RUGOSA



RHODOTORULA RUBRA



TRICHOSPORON sp.



CANDIDA LIPOLYTICA



CANDIDA KRUSEI



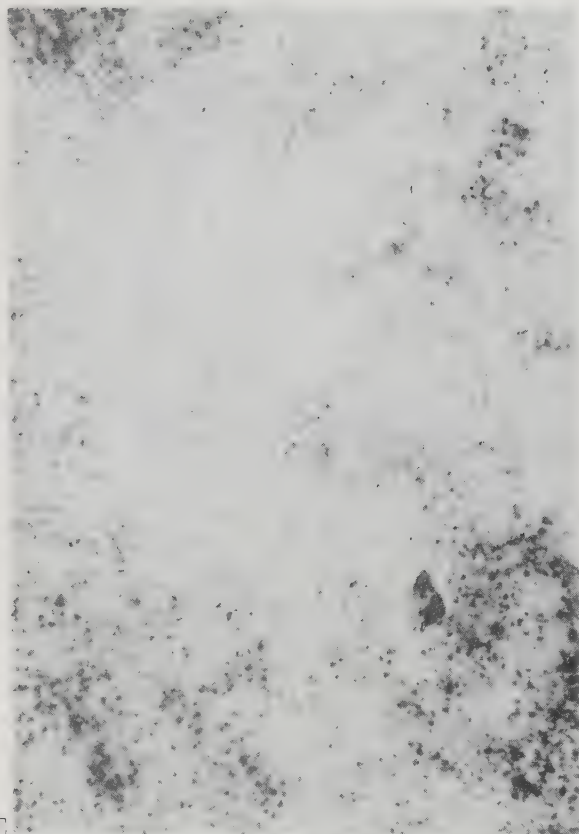
MONOPHIALIDE sp.



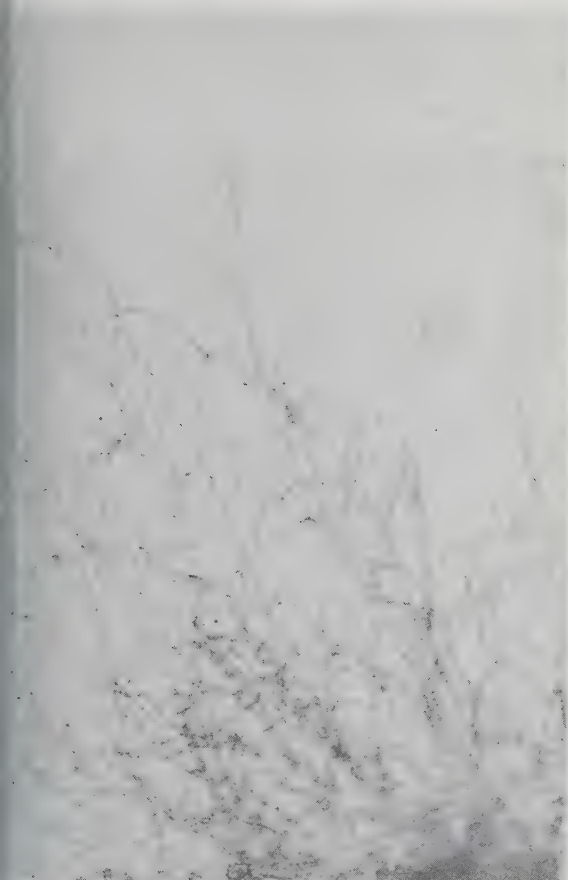
CANDIDA HUMICOLA



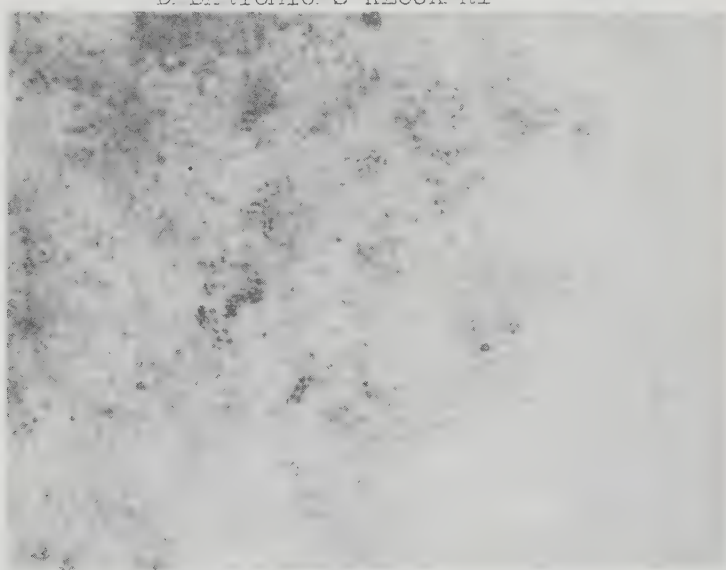
SACCHAROMYCES CEREVISIAE



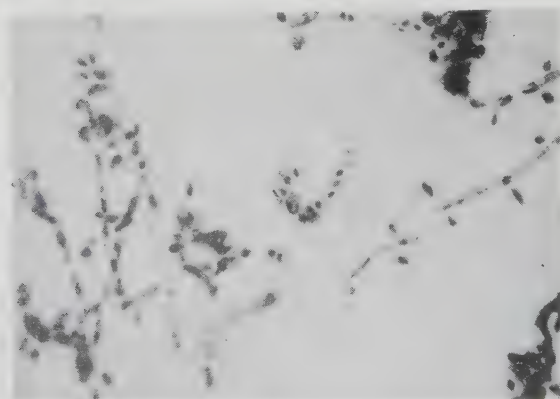
DEBARYOMYCES HANSENII



PICHLA FARINOSA

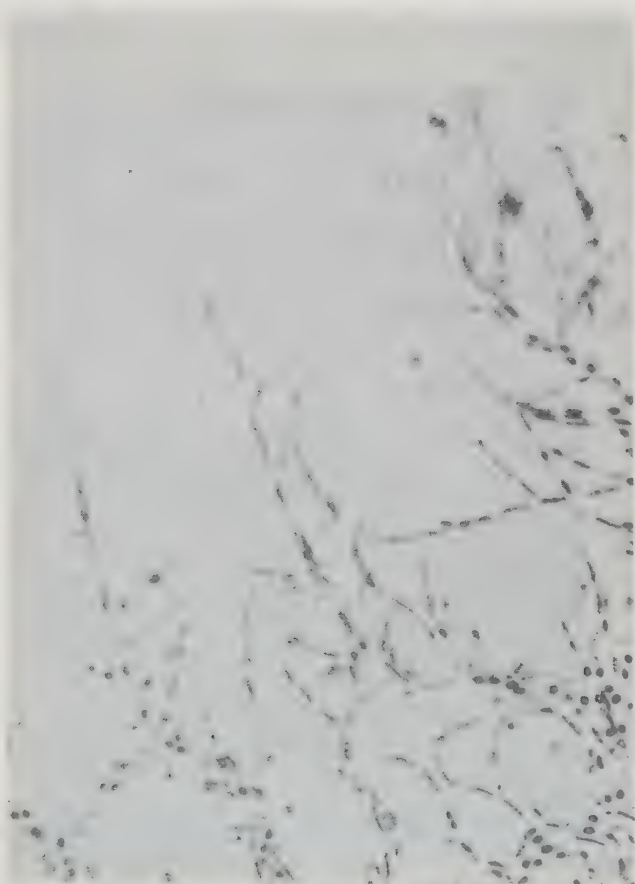
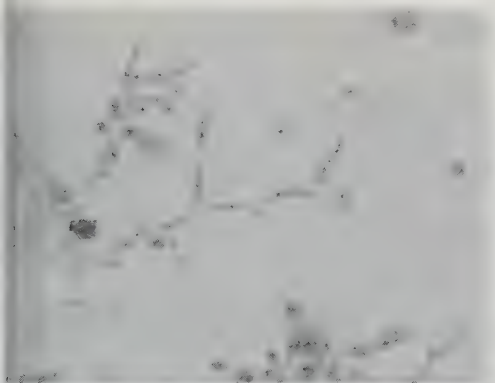
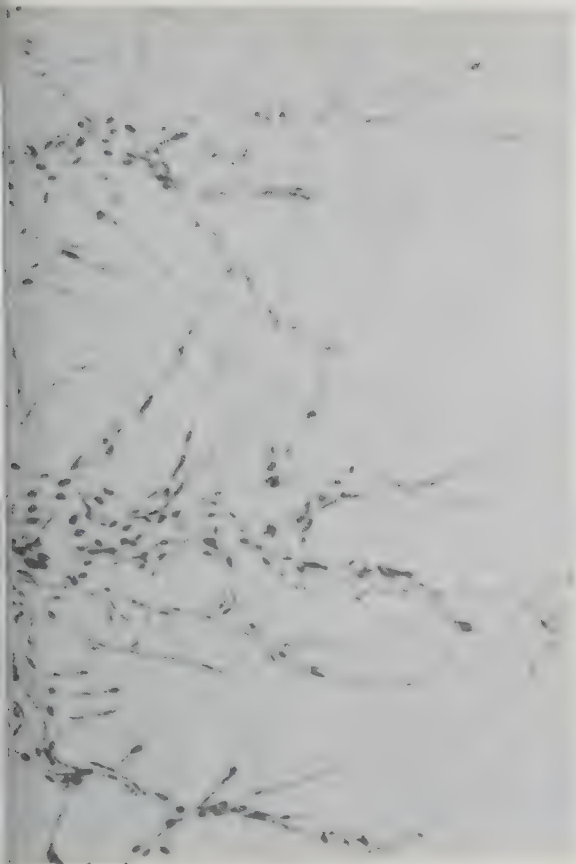


SCHIZOSACCHAROMYCES OCTOSPORUS

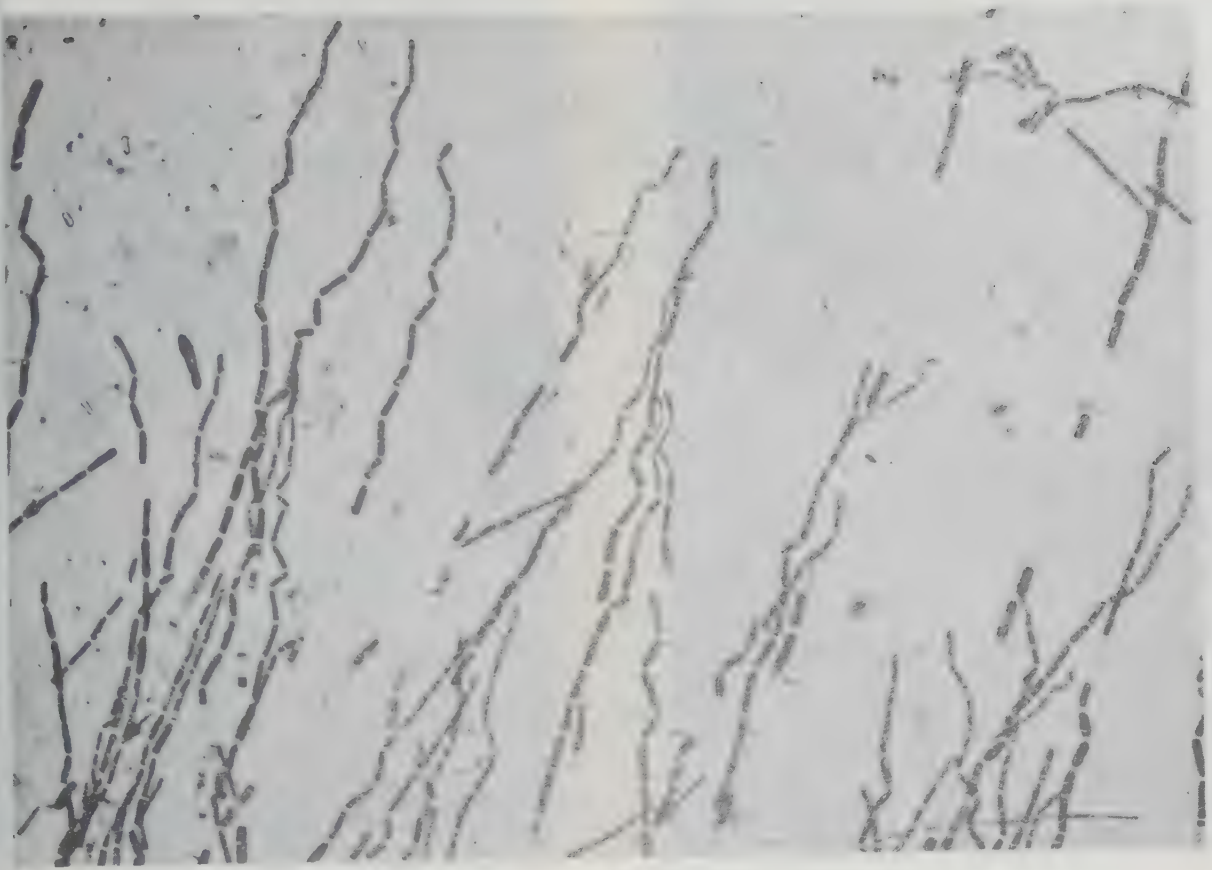


HANSENULA ELLIPSOIDEA

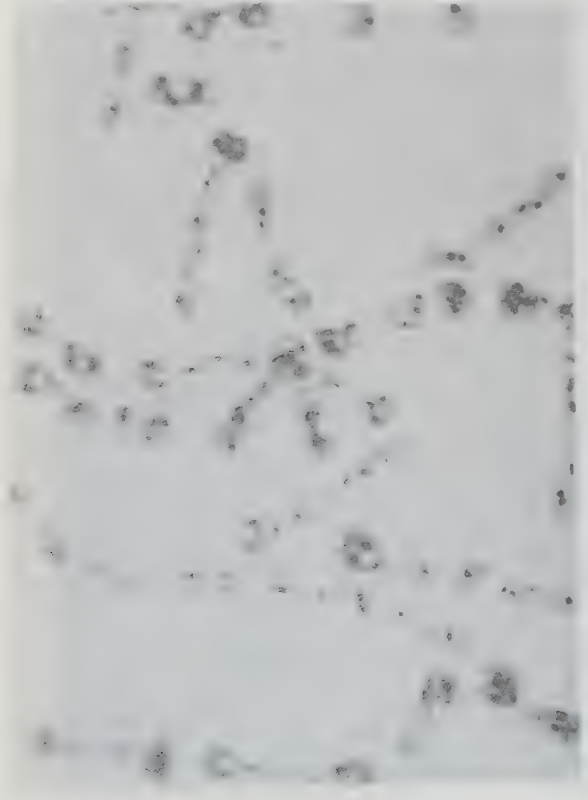
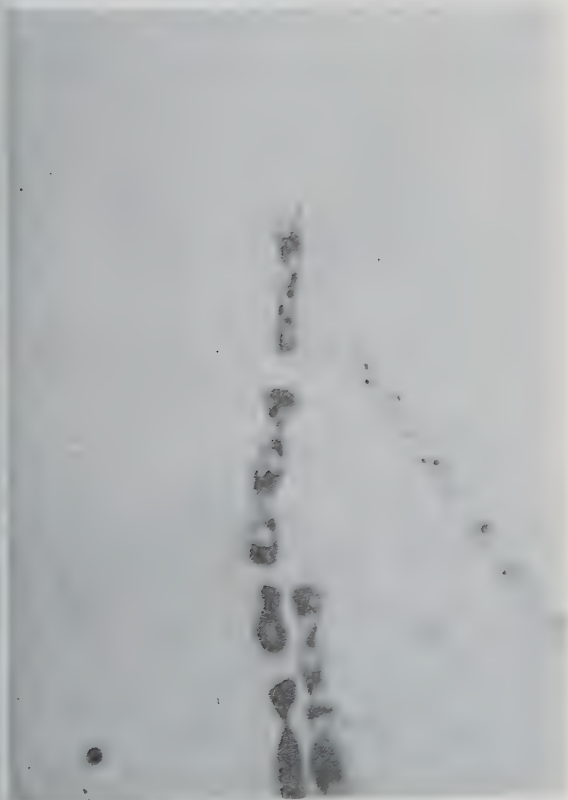


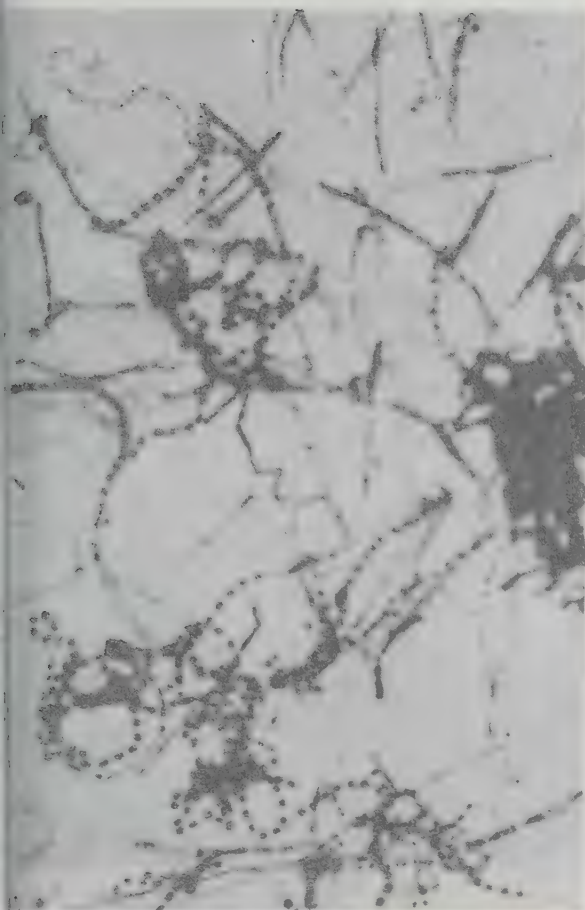


SACCHAROMYCES ACIDIFACIENS

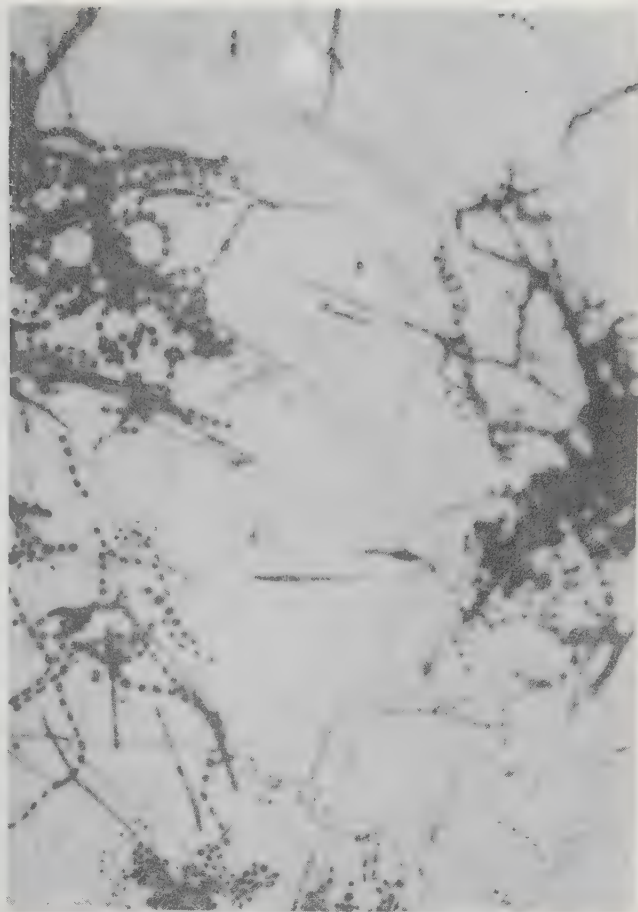


GEOTRICHUM CANDIDUM

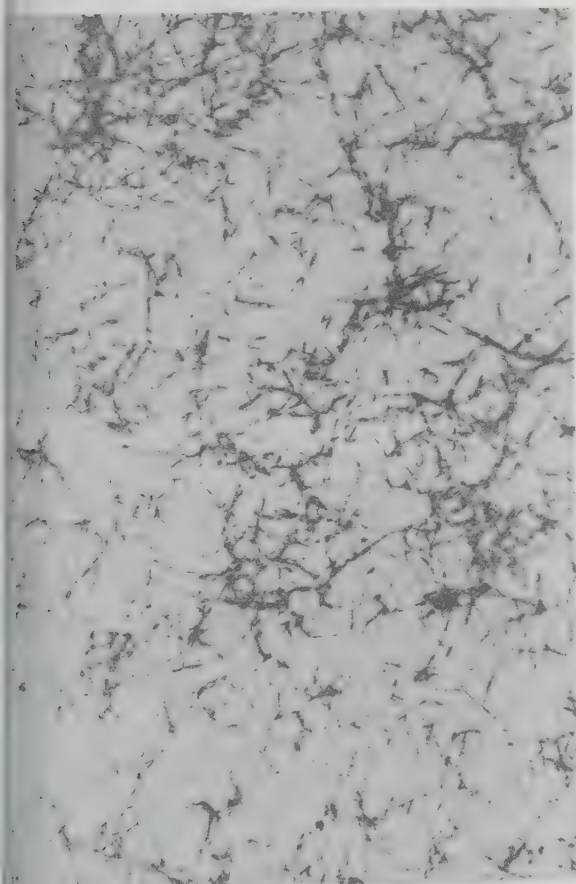




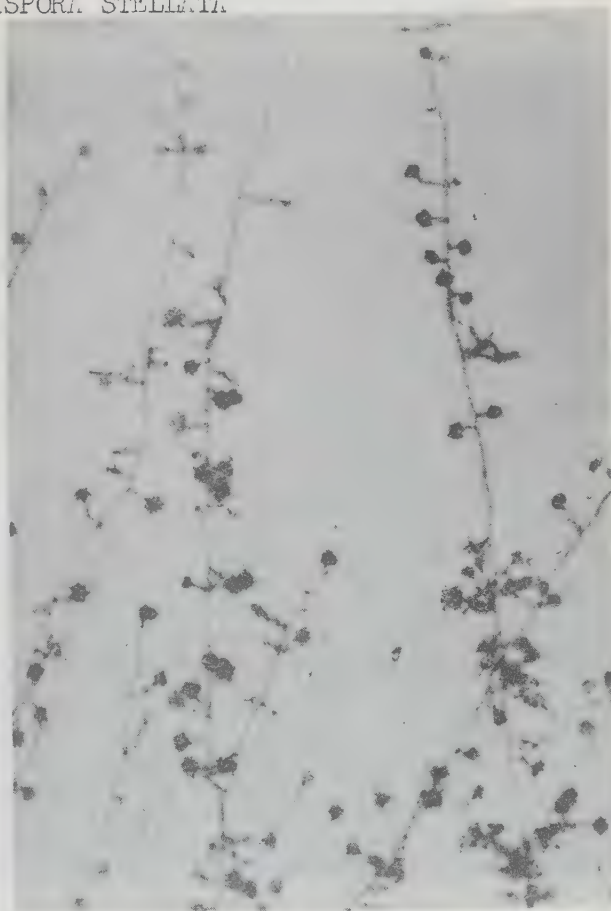
HEMISPORA STELLATA



HEMISPORA STELLATA

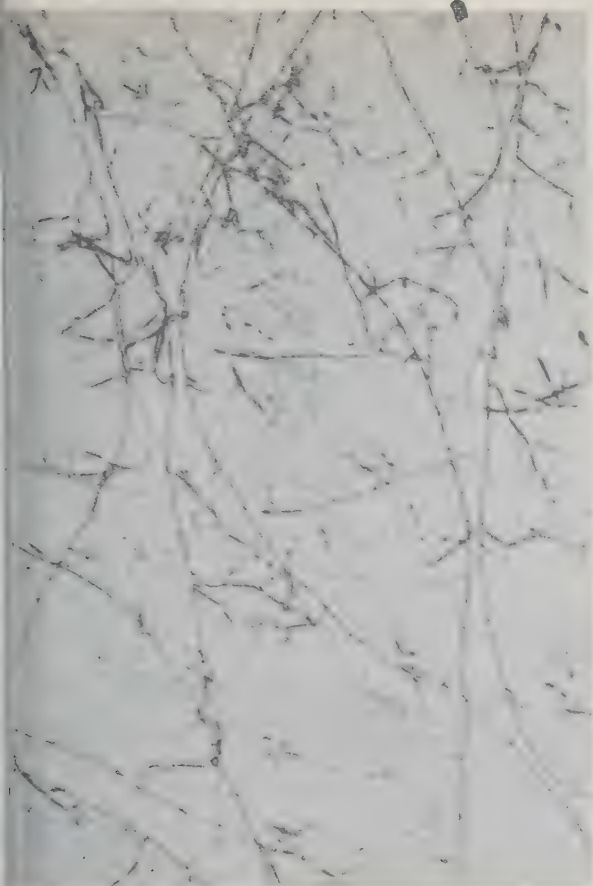


SPOROPHORA TORULIFORMIS



PHIALOPHORA VERRUCOSA

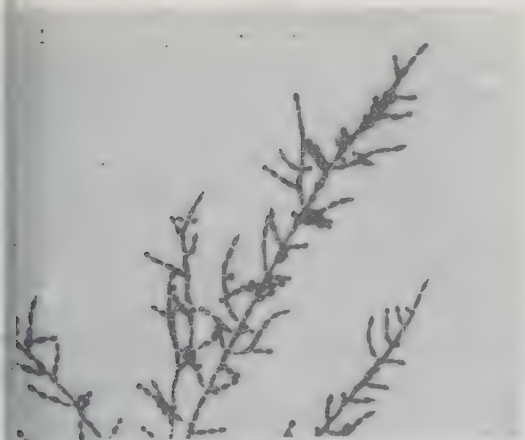




HORMODENDRON sp.



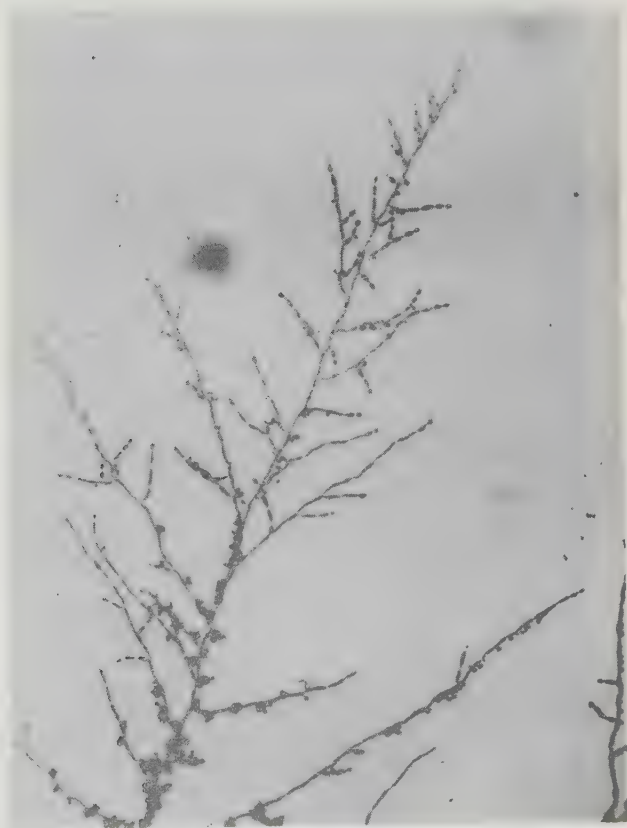
LEVURES NOIRES



LEVURES NOIRES



LEVURES NOIRES

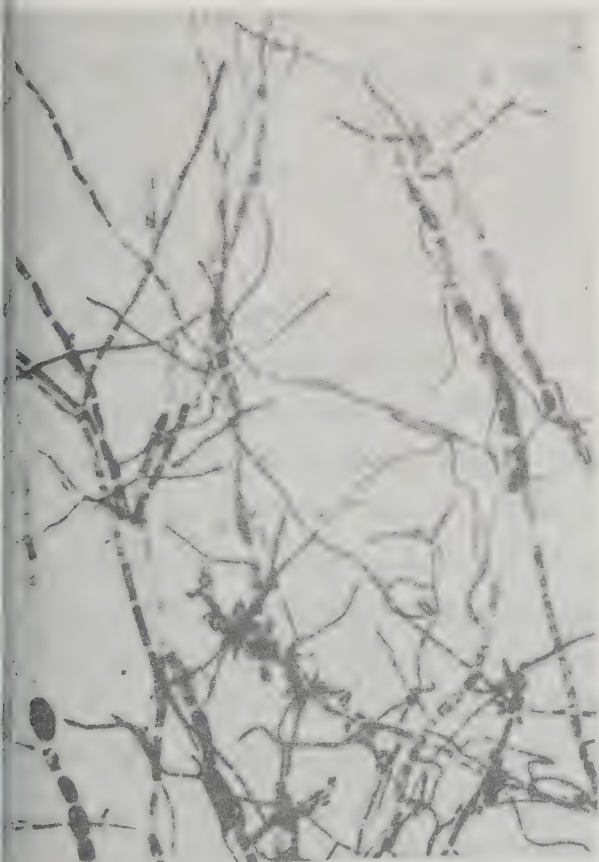




USTILAGO sp.



CANDIDA ALBICANS



PULLULARIA PULLULANS



Un aleuriosporé pédicellé

DEUXIEME PARTIE

ACTION DE CERTAINES MODIFICATIONS SYSTEMATIQUES DU MILIEU DE CULTURE SUR LA MORPHOGENESE .

A . INTRODUCTION .

a . Objet des présentes recherches .

Dans la première partie de notre exposé, nous avons décrit chez des champignons relativement simples et cultivables les aspects de leur développement par rapport à la surface du milieu en les systématisant, puis les aspects microscopiques de leur morphogénèse en dégagant les éléments de leur différenciation morphologique. Cette étude nous a permis de mettre en valeur un processus cytophysiologique général : la progression centrifuge du cytoplasme et d'établir par elle les relations entre différents états morphologiques macroscopiques et microscopiques. Sur la base des constatations précédentes on peut se demander quelle action exerce le milieu sur la forme ? Nous nous proposons d'étudier cette question en faisant varier simplement l'aération, la nature et la concentration de l'aliment ternaire, la nature et la concentration de la source d'azote. Nous exposerons des résultats d'ensemble sans entrer inutilement dans des détails concernant chaque espèce. De même nous laissons de côté l'étude de divers facteurs dont pourtant nous connaissons toute l'importance, mais cette étude ne pourrait être entreprise utilement que si on connaît préalablement le rôle de l'aération, de l'aliment ternaire et de la source azotée sur la morphogénèse. Rappelons donc pour mémoire l'influence de la température : espèces thermophiles, fermentations aux basses températures, champignons des glaciers, formation des sclérotés, reproduction parfaite de *NEUROSPORA SITOPHILA*, etc...; des radiations et notamment de la lumière : observations de MAHEU 1906 sur la formation et la constitution de carpophores de *Coprinus*, etc...; de la concentration du milieu en substances dissoutes : espèces osmophiles telles que diverses *Aspergillacées*, des *DEBARYOMYCES*; classement des champignons suivant leur pouvoir d'accommodation osmotique d'après BLOCHWITZ 1930 et HEINTZELER 1939, etc...; de la réaction du milieu : travaux de H.N. JOHNSON 1926, de MOLLIARD 1920, de FERNBACH et SCHOEN, de JACQUOT 1938, de THALER et EISENLOHR, de CUSTERS, de NICKERSON et CHADWICK 1946, etc.... Nos cultures sont laissées à 26°C, à l'abri de la lumière; évidemment la concentration en substances dissoutes et la réaction du milieu interviennent forcément .

b . Rappel historique .

PASTEUR (1876) établit pour la première fois l'influence du milieu sur la croissance et sur la forme des champignons .

Puis on a reconnu que des " aspects morphologiques convergents " peuvent être présentés, sous l'influence de l'habitat, par des champignons appartenant à des groupes très différents; ainsi on a reconnu des aspects de convergence ou " facies " hypogé, aspérinéen, xérophytique, etc...; on a établi que ces formes sont acquises au cours de longues évolutions par une adaptation (loi de convergence-éphasmonique de VESQUE 1882).

On a reconnu inversement que des champignons très voisins dans la classification peuvent être très dissimilaires dans leur apparence morphologique (HEIM 1937, MALENCON 1938); leur filiation est rétablie par une étude ontogénique et phylogénique.

De plus un même champignon peut être rencontré sous plusieurs états morphologiques distincts. Par exemple le *Discorycète* *SCLEROTINIA FUEKELIANA*, dont la forme parfaite est un périthèce de Pézize, présente une forme conidienne banale appelée *BOTRYTIS CINEREA*. De nombreux autres exemples classiques concernent notamment des parasites végétaux et la difficulté est de rattacher les formes observées les unes aux autres; elle est d'autant plus grande que certains de ces parasites sont hétéroïques et présentent une " spécificité parasitaire " étroite (espèces biologiques). Signalons toute l'importance des travaux concernant les champignons parasites des animaux (de MOMBREUX 1934 et alii). Qu'il s'agisse de Dermatophytes ou de champignons responsables de lésions viscérales, on est frappé par deux ordres de faits mis en lumière par HENRICI :

- le " monomorphisme parasitaire " s'opposant au " polymorphisme saprophytique ".

- la " réduction morphologique parasitaire " avec éléments souvent unicellulaires, dissociés, isolés, présentant un type de reproduction généralement simple soit par bourgeonnement, soit par scissiparité.

Les différences entre état saprophytique et parasitaire sont extraordinaires dans le cas de *HISTOPLASMA CAPSULATUM* D'ELLING 1908 qui, dans les tissus humains, se présente comme des éléments leishmaniformes isolés; le passage réciproque de l'état leishmaniforme à celui de champignon filamenteux par culture et vice versa par inoculation à l'animal confirme qu'il s'agit d'un champignon.

Ainsi l'action du milieu et plus spécialement du milieu vivant peut bouleverser la forme, mais l'action de ce dernier est extraordinairement complexe,

qu'il s'agisse d'un habitat ou d'un organisme vivant et, jusqu'ici, aucune action spécifique d'un facteur particulier n'a permis de la reproduire in vitro. Nous ne ferons que citer les expériences célèbres de G. KREBS sur SPORODINIA GRANDIS, Mucorinée homothallique, et sur les SAPROLEGNIA, parasites d'insectes; en fonction de variations systématiques de conditions de milieu et de culture, cet auteur est parvenu à établir les conditions de passage d'une forme parasite à une forme saprophytique et, en même temps, certains rapports entre le développement végétatif et la sexualité; nous devons faire observer que chez des Saprolegniales et des Entomophtorales, l'action parasitaire se poursuit, mais avec un caractère différent, au delà de la mort de l'hôte et ceci suffit à expliquer que l'on trouve, plus aisément dans le cas de ces champignons, des termes de passage entre les formes parasitaire et saprophytique.

Afin d'obtenir des expériences comparables dans le temps et qui puissent être étayées ultérieurement de quelques données quantitatives et aussi, parce que les modifications de forme obtenues sont d'un ordre plus général, nous avons dû limiter nos recherches à l'étude de l'action de quelques facteurs chez quelques champignons aisément cultivables et dont certains réagissent fortement et précocement à l'action du milieu.

B . ACTION DE L'AERATION .

On doit à PASTEUR (1876) les premières observations fondamentales sur les différences d'aspect morphologique présentées par un champignon cultivé tantôt en présence d'air, tantôt en aérobiose restreinte; cette dernière crée un véritable état de " réduction morphologique " qu'il s'agisse de levures ou de champignons filamenteux; la croissance est faible dans ces cas, mais la vie de ces organismes se maintient; toutefois les champignons sont toujours des organismes aérobies comme le démontrent les expériences célèbres de PASTEUR et de DENYS COCHIN, car une trace d'air est indispensable pour permettre initialement la multiplication cellulaire d'une levure sans que la quantité d'oxygène (on l'a prouvé depuis et BERAUD en fait un rapport détaillé) soit suffisante pour permettre la respiration; cette expérience fondamentale pose un problème de physiologie non encore résolu.

On doit à PLANTEFOL des déterminations respiratoires très précises chez les levures en fonction du temps, dans des atmosphères titrées et notamment chez des levures privées d'aliments; ces recherches aboutissent, parmi d'autres résultats importants, à démontrer que l'intensité respiratoire varie suivant les espèces et

même suivant les souches, que les exigences en oxygène sont très différentes d'un champignon à l'autre. Différents auteurs avaient constaté ce dernier fait, notamment avec les espèces : *SACCHAROMYCES CALSBERGENSIS* (levure basse), *S. CEREVISIAE* var. *ELLIPSOIDEUS* (levure haute), *CANDIDA UTILIS* qui exige une bonne aération ainsi que *RHODOTORULA GLUTINIS*, *EREMOTHECIUM ASHEYII*, excrétant de la lactoflavine en abondance dans le milieu et asphyxiant facilement, *ASPERGILLUS NIGER* capable de supporter le confinement, etc.... On a montré enfin l'influence d'une forte aération ou d'une aérobose très restreinte pendant quelques jours sur la respiration et le pouvoir fermentaire ultérieurs de levures (*CUSTERS* sur *BRETTANOMYCES CLAUSSENII*, etc...). Nous nous sommes borné à comparer l'influence d'une aérobose très restreinte et d'une aération habituelle sur le développement et sur la forme.

I . AEROBIOSE TRES RESTREINTE .

Si nous étudions par le procédé de GUERRA (milieu peptoné+sucre recouvert d'un bouchon de paraffine en tube étroit) la fermentation de différents sucres par les levures, nous constatons que certaines d'entre elles forment un voile très mince dès que le bouchon de paraffine est soulevé par le gaz carbonique; le fait est patent avec *CANDIDA KRUSEI*, divers *HANSENULA*; une trace d'oxygène déclanche la production de voile que l'on peut considérer comme une migration massive de cellules vers la surface et un processus équivalent, à cet égard, à la progression centrifuge du cytoplasme.

Reprenons cette même expérience avec des champignons azymatiques en les ensemençant sous huile de paraffine dans un milieu dégazé, les traces d'air apportées lors d'un ensemencement fait cependant avec la plus grande précaution sous ce rapport déclanchent, avec *CANDIDA HUMICOLA*, *C. LIPOLYTICA*, *GEOTRICHUM CANDIDUM* la production d'un voile à l'interface milieu-huile.

On peut penser que des levures zymatiques (douées de pouvoir fermentaire) sont a priori plus capables que les autres de s'adapter à des conditions d'aérobose très restreinte; les résultats précédents prouvent qu'il n'en est rien et ils nous permettent de dissocier, comme l'ont établi PASTEUR et DENYS COCHIN, l'action initiale de traces d'oxygène sur la multiplication cellulaire d'une part, sur le déclanchement de processus fermentaires d'autre part, ceux-ci n'apparaissant pas dans le cas de levures azymatiques; à notre avis, il est très difficile de le prouver directement, les traces d'oxygène provoquent en premier lieu la mobilisation du cytoplasme (voile) et déclanchent subséquemment la multiplication.

cellulaire.

On a pu considérer *SACCHAROMYCES CARLSBERGENSIS*, levure basse, comme étant un organisme anaérobie, il n'en est rien, car si nous ensemençons cette levure par dilution dans un culot de gélose nutritive en surfusion, il n'y a pas de formation de colonies dans son sein, alors que ceci est normal avec des bactéries anaérobies. Avec d'autres levures qui filamentisent : les *CANDIDA HUMICOLA*, *LIPOLYTICA*, *KRUSEI*, etc... ainsi qu'avec *GEOTRICHUM CANDIDUM*, nous ensemençons la gélose en culot par piqûre verticale, ces organismes se développent le long de la piqûre en formant à la longue un cône à base supérieure de filaments arborescents dans la gélose environnante; le fait que ce développement rayonnant immergé est d'autant plus important qu'on est plus près de la surface du culot montre l'influence initiale de l'aération sur le développement immergé ultérieur, toujours secondaire, nous l'avons vu, à un stade même limité de développement en surface.

Certains champignons paraissent présenter un bon développement et même un état morphologique différencié lorsque l'aération est restreinte; c'est par exemple le cas pour *CANDIDA HUMICOLA*, *C. LIPOLYTICA*, etc... qui filamentisent facilement et précocément, pour *GEOTRICHUM CANDIDUM* dont la forme est relativement fixe.

Chez nombre de champignons une faible aération freine considérablement la croissance et entraîne un état de réduction morphologique : état blastosporé pur sans élongation chez les levures, mycéliums non pigmentés, sans anastomoses, sans spores chez des *Aspergillacées* et des *FUSARIUM*; état levuriforme pur chez les *Dématiées* levuriformes, etc..., ces exemples s'ajoutant à celui bien connu de *MUCOR RACEMOSUS*.

Certains champignons présentent une apparence de développement dans des fioles contenant une solution pure d'un produit chimique (glucose, acides organiques, phosphates, etc...) même si ces fioles sont en Pyrex et pourvues d'un bouchon rodé, nettoyées chimiquement et remplies presque complètement; il y a formation très apparente d'un dépôt ou d'un mycélium soit glaireux adhérent au fond du récipient, soit floconneux et facilement remis en suspension; rien ne se développe en surface du liquide même avec des champignons formant normalement un voile; nous trouvons souvent un seul et même type de champignon pour une solution donnée; c'est ainsi que nous isolons un *ACREMONIUM* d'une solution tampon acide acétique-acétate, *SPOROPHORA TORULIFORMIS* d'une solution de phosphate monopotassique, *HORMODENDRON* de solutions de glucose et d'acides organiques; nous isolons de diverses solutions *PENICILLIUM GLAUCUM*, *P. MALVO-ROSACEUM*, *DEBARYOMYCES GLOBOSUS*,

RHODOTORULA MUCILAGINOSA, etc... et même constamment une algue d'une solution de sulfate de magnésium. Microscopiquement, on trouve ou des cellules isolées ou un mycélium avec chlamydospores, l'ensemble étant assez atypique en raison de phénomènes de gonflement; d'ailleurs après récolte on n'obtient, malgré l'apparence de développement, que quelques mg de poids sec. Nous avons pensé que ces organismes, tous azymatiques, susceptibles de vivre ou de s'adapter à des conditions d'aération restreinte, sont donc faiblement aérobies. Ils présentent d'ailleurs des caractères morphologiques correspondants lors des premiers repiquages : RHODOTORULA MUCILAGINOSA donne en effet des colonies pâles et non coulantes, SPOROPHORA TORULIFORMIS donne une colonie de levure absolument typique, de couleur jaune comme celle de RHODOTORULA FLAVA, constituée uniquement de conidies-levures, etc.... Le cas de ces champignons nous a paru si intéressant que nous avons éprouvé l'influence d'une aérobose antérieure restreinte sur la croissance et le métabolisme de champignons replacés dans de meilleures conditions d'aération.

2 . AERATION HABITUELLE .

Dans des conditions d'aération habituelle, tous les champignons se développent convenablement; on peut cependant remarquer des besoins très différents en oxygène:

- Certains champignons présentent une croissance optima dans des conditions d'aération que l'on peut considérer comme médiocres, nous avons déjà indiqué les caractères de ces organismes : CANDIDA LIPOLYTICA, GEOTRICHUM CANDIDUM, etc....

- Les Aspergillacées ont déjà une bonne croissance en atmosphère relativement confinée, mais ils sont très sensibles à une forte restriction en oxygène dont nous avons vu les effets sur leur morphogénèse.

- Viennent ensuite certains champignons qui ne peuvent se développer qu'en surface de milieux liquides : EREMOTHECIUM ASHBYI, les RHODOTORULA et SPOROBOLOMYCES à pigments caroténoïdes, les différentes " levures noires ", etc...; une moins bonne aération freine très fortement leur croissance.

- Chez d'autres champignons, la croissance augmente nettement avec l'aération, c'est notamment le cas de PULLULARIA PULLULANS et de HANSENULA ELLIPSOIDOSPORA. PULLULARIA PULLULANS est très vite freiné dans sa croissance par une diminution d'aération, mais sa différenciation morphologique depuis l'état chlamydospores monomorphe jusqu'à l'état DEMATIUM polymorphe augmente avec l'aération. HANSENULA ELLIPSOIDOSPORA est une levure haute à caractéristiques complètes; tout en étant capable de supporter une forte restriction en oxygène puisqu'il peut

former un voile dans ces conditions (au sortir d'épreuves de fermentation), sa croissance et la différenciation morphologique augmentent avec l'aération : élongation cellulaire, filamentisation, ascosporeulation, tous caractères ayant avec la progression centrifuge du cytoplasme les rapports que l'on sait; on peut donc dire que l'aération stimule la progression centrifuge du cytoplasme; d'ailleurs des caractères tels que la production d'asques ne s'observant qu'en aérobiose.

Après avoir essayé de répartir les organismes étudiés en quatre catégories d'après leurs réactions à l'action de l'aération, on constate qu'il y a de grandes variations et on peut aussi concevoir une autre manière de classer ces mêmes champignons suivant qu'ils sont capables de s'accomoder de tensions en oxygène très différentes (*SACCHAROMYCES*, *HANSENULA*, etc...) ou doivent se développer dans des conditions d'aérobiose étroites (*EREMOTHECIUM ASHBYI*, etc...).

3 . RESUME .

Dans des conditions d'aération très restreinte, on est frappé par le fait que certains champignons présentent déjà une croissance appréciable et une différenciation morphologique presque complète; ces champignons ont un développement extensif et même une tendance spontanée au développement secondaire en profondeur de milieux solides (immersion); leur croissance est déjà optima dans des conditions d'aération très médiocres que nous préciserons.

D'autres champignons, pourtant azymatiques, sont adaptés spontanément à une vie pratiquement sans air et présentent, lors de repiquages sur milieux normaux, des caractères qui se rapportent à ce passé physiologique, par exemple un état levuriforme initial.

D'autres champignons présentent, dans ces conditions d'aération très restreintes, une diminution considérable de croissance et un certain état de réduction morphologique. Leur croissance et leur différenciation morphologique augmentent avec l'aération : élongation cellulaire, filamentisation, production d'asques chez les levures; formation d'anastomoses et développement d'un appareil conidien chez les champignons filamenteux ; tous phénomènes morphologiques qui présentent avec la progression centrifuge du cytoplasme les rapports que l'on sait .

En considérant les cas extrêmes : déclenchement de la croissance par des traces d'air et différenciation morphologique augmentant avec l'aération, tout se passe selon nous de la manière suivante :

- l'oxygène déclanche les courants cytoplasmiques

- les courants cytoplasmiques, dont se dégage la " progression centrifuge du cytoplasme " augmentent avec l'aération croissante jusqu'à une certaine limite, variable, nous l'avons vu, suivant les organismes (notons, en passant, que cette progression centrifuge du cytoplasme, nous la retrouvons chez les bactéries aérobies)

Ajoutons une autre constatation banale, mais importante : dans des conditions de culture habituelles, l'aération est indispensable pour la production de pigments caroténoïdes, mélaniques ou autres, de pigments diffusibles (à part peut-être des flavines) ou fixes.

C . ACTION DE L'ALIMENT TERNAIRE .

Nous avons constaté que l'action de l'aliment ternaire sur la morphogénèse diffère suivant qu'il s'agit d'un sucre fermentescible (sous le rapport de la fermentation alcoolique) ou d'un sucre ou tout autre aliment ternaire infermentescible, ceci même chez des organismes azymatiques.

Pour étudier le premier cas, nous avons utilisé les sucres servant à la détermination des levures, au cours d'épreuves de fermentation et d'assimilation (méthode de BEIJERINCK); le terme " assimilation " est pris dans le même sens que le terme " Zuckeratmung " (respiration des sucres) adopté par les auteurs germaniques; les sucres employés sont le glucose, le galactose, le saccharose, le maltose, le lactose, le raffinose. Avec diverses levures, zymatiques ou non, formant un voile, nous constatons la décroissance de celui-ci dans l'ordre général : glucose, saccharose, maltose, lactose; cet ordre est général parce que nous le retrouvons pour d'autres manifestations : production de pigments, etc.... On tend à attribuer un rôle de plus en plus important aux processus d'adaptation enzymatique (KARSTRÖM, STEPHENSON et coll., MONOD) dans l'utilisation de sucres autres que le glucose et le fructose; nous observons, chez les CANDIDA KRUSEI et LIPOLYTICA, une assimilation adaptative du saccharose alors que les résultats de la méthode auxanographique de BEIJERINCK sont négatifs, avec quelques données quantitatives que nous ne rapporterons pas ici; cette assimilation, tardive, s'accompagne d'immersion dans les milieux de culture solides.

L'emploi de substances infermentescibles nous permet de reserrer la détermination des levures en distinguant celles qui ne les utilisent pas ou peu: nombreux SACCHAROMYCES; celles qui utilisent les alcools (glycérol) : nombreux DEBARYOMYCES par exemple; celles qui utilisent les alcools et les acides organiques comme seul substrat énergétique : HANSENULA, PICHIA, CANDIDA KRUSEI, C. BRUMPTI, C. LIPOLYTICA,

C. HUMICOLA, GEOTRICHUM CANDIDUM, etc.... Les acides organiques " assimilables " sont les acides succinique, citrique, tartrique, lactique, etc..., dont, suivant les conceptions biochimiques modernes fortement étayées par des données enzymologiques, l'utilisation se fait d'abord par déshydrogénation; nous constatons qu'ils ne conviennent, quelque soit l'organisme, comme aliment ternaire que dans des conditions d'aération excellente; il en est de même pour les alcools; ceci contraste en apparence avec la nécessité de leur déshydrogénation préalable, mais nous montrerons la généralité de ces faits chez les champignons et nous pourrions en donner une explication. D'ailleurs celle-ci s'appuiera en partie sur l'action morphologique remarquable de ces substances qui équivaut à celle d'une meilleure aération en favorisant hautement la progression centrifuge du cytoplasme et les manifestations qui s'y rattachent. Les acides organiques précités favorisent hautement la production de voile que nous considérons comme un processus homologue de la progression centrifuge du cytoplasme; il devient très épais, membraneux et même pigmenté. Le glycérol favorise en particulier la production et la persistance des pigments caroténoïdes chez les RHODOTORULA (FROMAGEOT et TCHANG-JOUE) ainsi que la formation de pigments mélaniques chez PULLULARIA PULLULANS.

D . ACTION DE DIFFERENTES SUBSTANCES AZOTEES .

On utilise, pour des milieux de culture usuels, des substances azotées complexes : peptones, caséines, eau de levures, eau de touraillons, substances azotées du mout de bière et on obtient, grâce à leur emploi, une croissance optimale.

L'asparagine est une source azotée classique pour la préparation de milieux synthétiques; nous lui préférons l'acide glutamique qui ne nécessite pas d'être stérilisé à part et ne présente qu'une fonction azotée : amine.

L'ammoniaque ne peut être fourni que sous forme de sels : généralement sulfate d'ammonium dont l'utilisation provoque nécessairement et au fur et à mesure l'acidification du milieu. Avec les sels organiques de l'ammoniaque, cette acidification serait moins forte, mais on fait intervenir en même temps l'action de l'ion succinique, etc.... Le sulfate d'ammonium est une très mauvaise source d'azote pour les SACCHAROMYCES, les PICHIA, les HANSENULA, alors qu'il assure une bonne croissance des CANDIDA KRUSEI, HUMICOLA, LIPOLYTICA, de GEOTRICHUM CANDIDUM qui supportent une forte acidification du milieu (pH final 2,2 et même moins). En milieu solide et en milieu liquide, le sulfate d'ammonium entraîne l'immersion dès que l'acidification freine la croissance. PULLULARIA PULLULANS prend une forme

mycélienne pure, jaunâtre, sans conidies sur milieu sulfate d'ammonium-glucose.

L'azote aminé n'est pas non plus d'un emploi simple, car l'influence du restant de la molécule d'un acide aminé est considérable. Certains acides aminés : alanine, acide aspartique, acide glutamique, sont toujours utilisables, donnent, comme les substances azotées complexes et l'asparagine, une forte croissance et un bon développement en surface.

Les autres acides aminés peuvent servir ou non de source azotée; ceci dépend de leur structure et du champignon utilisé, donc d'un équipement enzymatique correspondant. Chacun a une action différente sur la morphogénèse, mais assez générale pour un acide aminé déterminé. Les plus intéressants nous ont paru être la tyrosine, la leucine, le glyocolle, la cystéine, non seulement pour classer les organismes suivant qu'ils sont assimilables ou non, mais en raison de cette action propre sur la morphogénèse.

Peu de levures utilisent la tyrosine comme source d'azote unique. Sur milieu gélosé incliné, comme la tyrosine est pratiquement insoluble, son utilisation se caractérise par l'éclaircissement du milieu et nous remarquons que celui-ci débordé nettement l'étendue du thalle. En milieu liquide nous observons la disparition des cristaux et ce fait assez curieux que les champignons adhèrent aux cristaux. Les *SACCHAROMYCES* n'utilisent pas la tyrosine. *HANSENULA ELLIPSOÏDOSPORA* l'utilise en milieu liquide. Les *CANDIDA LIPOLYTICA* et *HUMICOLA* en milieu solide avec production de pigment mélanique diffusible qui ne se forme pas dans tubes à essai contenant le même milieu, mais liquide; si, dans ces dernières conditions, nous remplaçons le glucose par l'alanine, le pigment diffusible apparaît, mais sa production est inhibée si à ce milieu tyrosine-alanine nous ajoutons de la cystéine. Parmi les *Aspergillacées*, certaines utilisent la tyrosine, mais les *Dématiées*, dont le pigment est histochimiquement une mélanine, ne nous ont pas paru être capables d'utiliser la tyrosine comme source unique d'azote; il en est du moins ainsi pour tous les *ALTERNARIA*, les *HORMODENDRON*, les "levures noires", *PULLULARIA PULLULANS*.

La tyrosine et, à un degré moindre, la leucine favorisent la production de voile, l'élongation cellulaire, la filamentisation, la production d'asques avec souvent grosses ascospores à enclaves lipidiques importantes; l'abondance des asques est souvent caractéristique. Ces substances favorisent en outre la production et la persistance des pigments caroténoïdes (J. MERY). Certaines de ces propriétés montrent que la tyrosine favorise la progression centrifuge du cytoplasme et l'ensemble de ces propriétés qu'elle agit dans le même sens qu'une aération

plus intense. Malheureusement, la faible solubilité de cette substance nous a empêché de poursuivre, avec elle, des recherches sur le plan quantitatif.

Le glyocolle est utilisé par *CANDIDA HUMICOLA*, *SPOROPHORA TORULIFORMIS*, les *RHODOTORULA*, ces derniers formant en sa présence un pigment abondant, intense et persistant (J. MERY); il n'est pas utilisable par *PULLULARIA PULLULANS* comme source unique d'azote. Au point de vue morphologique, nous faisons les remarques suivantes : le glyocolle n'empêche pas la production de voile, mais ne la favorise pas, il n'y a pas pratiquement d'elongation cellulaire, de filamentisation, de production d'asques. Finalement, si le glyocolle donne une bonne croissance, il limite plutôt l'extension du champignon et celui-ci ne se développe pas secondairement en profondeur des milieux solides. En effet le glyocolle ne favorise pas la progression centrifuge du cytoplasme que nous trouvons presque aussi abondant et également réparti dans toutes les cellules; son action est sur bien des points opposée à celle de la tyrosine.

La cystéine a, selon nous, une influence sur la morphogénèse qui est l'antagoniste de celle d'une meilleure aération ou de l'intervention de la tyrosine : elle s'oppose à la production de voile, à l'élongation cellulaire, à la filamentisation, aux processus de conjugaison, à la production d'asques, à la réalisation d'anastomoses, à la formation d'appareils conidiens, au développement secondaire vers la profondeur des milieux solides; en somme elle freine la progression centrifuge du cytoplasme. Mais l'action de la cystéine est difficile à établir directement, car elle est toxique et elle l'est toujours par production d'acide sulfhydrique pour les levures donnant la fermentation alcoolique. Elle n'est pas pratiquement utilisée par *PULLULARIA PULLULANS* sans être cependant toxique pour lui. Elle peut servir de source d'azote, d'ailleurs médiocre, pour les *CANDIDA LIPOLYTICA* et *HUMICOLA*. Dans ces conditions, nous avons établi indirectement l'action remarquable de cette substance sur la morphogénèse en l'ajoutant en faible quantité aux milieux de culture, indiquons que la cystéine inhibe alors la production et la persistance des pigments caroténoïdes chez les *RHODOTORULA* (J. MERY), qu'elle empêche, comme nous l'avons vu, la mélanogénèse chez *CANDIDA LIPOLYTICA* et la production de pigments en général.

En résumé, l'ammoniaque et les acides aminés, dont on trouve les groupes fonctionnels (glycyl, cysteyl, etc...) dans les protéines ou les polypeptides des champignons peuvent servir de source d'azote unique pour leur croissance; mais il y a à cet égard de grandes différences suivant les espèces; par exemple, les *CANDIDA LIPOLYTICA* et *HUMICOLA*, organismes protéolytiques, utilisent la tyro-

sine, le glycocolle, la cystéine et produisent des pigments mélaniques à partir de la tyrosine, fait que nous avons été les premiers à établir, tandis que *PULLULARIA PULLULANS*, à pigments mélaniques, n'utilise aucun de ces trois acides aminés. *HANSENULA PELLIGODOSPORA* utilise la tyrosine sans produire de pigment, mais la cystéine est toxique pour lui. Ces exemples peuvent être multipliés indéfiniment. Il nous paraît plus intéressant d'insister sur le fait que toutes ces substances azotées ont une influence différente sur la morphogénèse et sur la pigmentation que les unes favorisent comme le ferait une meilleure aération, que d'autres freinent au contraire, la différenciation morphologique nous apparaissant liés à l'importance des courants cytoplasmiques et notamment de la progression centrifuge du cytoplasme. Malheureusement les difficultés d'expérimentation avec ces substances sont grandes et nous avons été amenés à chercher par d'autres voies des réponses aux questions que nous avons posées.

E. ACTION DU NITRATE DE SODIUM .

Par sa nature de source azotée riche en oxygène et dont l'utilisation nécessite la réduction en azote aminé, le nitrate de sodium s'oppose à toutes les autres. Seuls peuvent l'utiliser les champignons ayant un équipement enzymatique correspondant que nous n'avons jamais réussi à faire apparaître chez les organismes reconnus classiquement comme non nitratophiles. Si beaucoup de champignons filamenteux sont capables d'utiliser le nitrate de sodium, on connaît parmi les levures les genres et espèces suivants (LODDER et KREGER van RIJ) : *HANSENULA*, *BRITTANOMYCES*, les *TORULOPSIS MAGNOLIAE*, *ETCHELSII*, *GLOBOSA*, *LACTIS CONDENSIS*, *VERSATILIS*, les *CANDIDA UTILIS* et *PELLICULOSA*; parmi les espèces azymatiques : *ENDOYCOPSIS BISPORA*, les *CANDIDA MELINII* et *SCOTTI*, les *TRICHOSPORON PULLULANS*, *RHODOTORULA GLUTINIS* et *APANTHACA*, les *SPIROBOLOMYCES SALMONICOLOR*, *ROSEUS*, *ODORUS*, *HELSATICUS*. C'est donc un excellent caractère de détermination et on constate qu'il ne présente aucun rapport avec ou non un caractère morphologique ou biochimique déterminé. Parmi les espèces que nous avons pu étudier, seuls les *HANSENULA* et *CANDIDA UTILIS* ainsi que *RHODOTORULA GLUTINIS* utilisent facilement le nitrate de sodium comme source unique d'azote. Cette comparaison amène à rechercher pourquoi d'autres organismes l'utilisent moins bien.

Quand l'organisme se développe bien sur nitrate de sodium-glucose ou saccha-

rose, nous constatons :

- la formation d'un voile précoce, rapidement plissé, voire pigmenté.
 - une bonne croissance en surface du milieu solide avec souvent extension secondaire en profondeur.
 - une élongation cellulaire importante (fait déjà remarqué par LINOSSIER et ROUX 1898, confirmé par LANGERON et GUERRA) avec une forte évolution filamenteuse.
 - une production favorisée d'asques.
 - une pigmentation intense et persistante chez les RHODOTORULA (J. MERY).
- En somme le nitrate de sodium favorise la progression centrifuge du cytoplasme et les manifestations morphologiques qui lui sont liées; ses effets sont comparables à l'influence d'une très bonne aération.

Beaucoup plus nombreuses sont les levures pourtant nitratophiles, mais qui utilisent difficilement le nitrate de sodium comme source unique d'azote; dans ces cas les phénomènes morphologiques sont analogues à ceux obtenus lors d'une restriction en azote du milieu dont nous verrons ultérieurement l'action remarquable.

L'emploi de levures nitratophiles zymatiques nous a permis de faire l'observation suivante dont nous apprécierons ultérieurement la portée : en employant le procédé de GUERRA pour les fermentations, mais en remplaçant la peptone, l'eau de levures ou le sulfate d'ammonium par le nitrate de sodium, la fermentation est nulle ou très tardive et très faible; ces résultats sont observés notamment chez les HANSENULA, les CANDIDA UTILIS et PELLICULOSA. Il faut beaucoup plus d'air pour obtenir la fermentation en présence de nitrate de sodium comme nous le constatons en employant des tubes à essai ordinaires et sans bouchon de paraffine recouvrant le milieu. Tout ceci tendrait à prouver qu'il faut plus que des traces d'oxygène pour mobiliser le cytoplasme en présence de nitrate de sodium. Avec les champignons filamenteux les résultats sont tout aussi intéressants; quand le nitrate de sodium convient comme source d'azote, le développement et les caractères morphologiques se rapprochent également de ceux obtenus avec une aération intense.

Un cas particulièrement intéressant est celui de levures ou champignons filamenteux ayant vécu préalablement dans des conditions d'aérobiose restreinte : ils utilisent très mal l'azote nitrique quand ils sont replacés dans de meilleures conditions d'aération; c'est notamment le cas pour les champignons tirés de solutions de substances chimiques, dont nous avons déjà fait mention, tels que SPOROPHORA TORULIFORMIS, des HORMODENDRON; l'utilisation du nitrate de sodium ne devient convenable qu'après plusieurs repiquages sur milieux usuels bien aérés. Il

y a donc pour cette catégorie d'organismes adaptation à l'utilisation de l'azote nitrique comme il y avait adaptation à une aérobose plus forte au sortir de conditions d'aération restreinte où ils vivaient; les réactions morphologiques le prouvent et leur constatation nous a incité à faire des recherches quantitatives dans ce sens pour essayer de préciser les phénomènes métaboliques correspondants.

En résumé, le nitrate de sodium influence la morphogénèse comme le ferait une meilleure aération en favorisant, comme elle, la progression centrifuge du cytoplasme. Levures et champignons filamenteux nitratophiles utilisent plus ou moins facilement cette substance suivant les espèces et aussi suivant les conditions de vie antérieure plus ou moins aérobie. La multiplication cellulaire et la fermentation alcoolique par les levures nitratophiles sont très faibles en tubes de fermentation avec le nitrate de sodium comme source unique d'azote.

F. ACTION DE LA RESTRICTION EN AZOTE DU MILIEU.

Toutes autres conditions restant égales, nous diminuons la quantité d'azote du milieu, nous nous apercevons que cette restriction en azote, limitant nécessairement la protéogénèse et par conséquent la multiplication cellulaire, donc la " croissance vraie ", provoque toutefois chez certains champignons un développement extensif important et orienté précocément vers la profondeur après un stade limité de développement en surface du milieu solide ou liquide. Ainsi la restriction en azote provoque l'immersion dans les milieux de culture et il semble nous revenir d'avoir fait les premiers cette constatation et aussi celle qu'elle est le facteur déterminant le plus constamment cette réaction. Elle est d'autant plus accentuée que la concentration en sucre du milieu est plus forte alors qu'avec un milieu riche en azote l'augmentation de la concentration en sucre s'oppose au contraire à l'immersion. Cet effet morphologique si remarquable de la restriction en azote du milieu nous a permis de dissocier la croissance vraie et la croissance apparente par extension du champignon. Corollairement les hautes teneurs en azote, le glycocolle ont un effet inverse en favorisant la croissance vraie, mais non le développement extensif.

Les réactions sont cependant un peu différentes suivant les champignons : par exemple les CANDIDA LIPOLYTICA et HUMICOLA, GEOTRICHUM CANDIDUM présentent le développement en profondeur le plus important sous l'effet d'une restriction azotée. Par contre, les levures donnant des colonies coulantes ou les levures ne filamentisant pas ne s'immergent pas. Un champignon filamenteux se développant

normalement en hauteur, genre GRAPHIUM, s'immerge, mais ne produit pas alors d'appareil sporifère. Avec PULLULARIA PULLULANS, TRICHOPHYTON FERRUGINEUM, le pigment s'étend au niveau de la partie immergée. Pratiquement, la plupart des champignons donnant des colonies spongieuses ne se développent que faiblement en profondeur sous l'effet de la restriction en azote du milieu. Avec les Dématiées levuriformes, les mycéliums immergés prennent un aspect rayonnant en profondeur qui rappelle celui d'un CANDIDA dans les mêmes conditions (convergence filamenteuse). Avec un NOCARDIA sp., il ya filamentisation profonde, mais la pigmentation caroténoïde ne s'y étend pas. Nous avons observé l'immersion, sous l'effet de la restriction en azote, chez diverses bactéries filamenteuses.

Au point de vue microscopique on est frappé par l'importance de l'élongation cellulaire et l'abondance des spores de conservation, mais encore plus par le fait que le cytoplasme ne se trouve qu'à l'extrémité des filaments mycéliens ou pseudo-mycéliens immergés avec d'importantes enclaves lipidiques en amont. L'orientation de la progression centrifuge du cytoplasme est inversée par rapport à celle que l'on constate lors du développement d'un appareil sporifère aérien; celui-ci fait défaut dans le cas de l'immersion.

On pourrait penser que l'immersion est liée à la nécessité pour le champignon de rechercher l'azote dans le milieu solide. Or la même constatation est faite en milieu liquide où l'azote diffuse beaucoup plus rapidement. D'autre part, si nous ensemençons par dilution un culot de galose nutritive en surfusion et une même gélose en culot ne contenant que des traces d'azote, dans le premier cas il y a seulement développement en surface, dans le second il y a seulement développement au dessous de la surface de la gélose et près d'elle sous forme de petites colonies isolées; l'expérience est particulièrement probante avec des levures telles que les CANDIDA ALBICANS et LIPOLYTICA. Une autre observation contribue à éclairer la nature du phénomène : la restriction en azote, en milieu liquide, provoque moins rapidement l'immersion à partir d'un voile lorsque l'aération est restreinte au dessus de celui-ci. De même si un tube de gélose inclinée est rempli par exemple à mi hauteur d'eau, le champignon ne s'immergera que dans la partie de la gélose non recouverte par le liquide. Ces différents faits nous ont conduit à penser que la restriction en azote sensibilisait le champignon à l'action de l'oxygène d'autant plus que les parties immergées du thalle présentent, comme nous l'avons dit antérieurement, certains caractères de thalle développé en présence d'air : accentuation de la progression centrifuge du cytoplasme, élongation cellulaire, pigmentogénèse et production d'enclaves lipidiques. Des résultats quan-

titatifs étai^{er}ont ces diverses observations.

En résumé, la restriction en azote freine la croissance, mais favorise le développement extensif surtout en profondeur et on doit distinguer cette tendance extensive de la croissance vraie par multiplication cellulaire. La restriction en azote accentue la progression centrifuge du cytoplasme et les diverses manifestations morphologiques qui s'y rattachent à l'exception du développement d'un appareil sporifère aérien, car le sens de cette progression est inversé, comme si le cytoplasme fuyait l'oxygène. On fait donc cette constatation morphologique importante que la progression centrifuge du cytoplasme

- peut être accentuée dans des cas où la croissance vraie est freinée alors que BULLER et alii l'ont toujours reconnue au cours de la croissance vraie et comme liée à celle-ci; nous sommes les premiers, semble t-il, à avoir reconnu que ce processus est relativement indépendant de la croissance vraie, appelée par nos prédécesseurs, confondant dans un terme global habituel la croissance vraie et le mode d'extension : croissance terminale et centrifuge.

- est orientée inversement dans le cas de développement d'un appareil sporifère aérien et dans le cas de l'immersion de thalles; nous sommes les premiers, semble t-il, à l'avoir observé, puis reproduit expérimentalement. Cependant le thalle immergé présente certains caractères de thalle développé en présence d'air, ce qui nous fait penser que la restriction en azote sensibilise le champignon à l'action de l'oxygène.

En définitive, la progression centrifuge du cytoplasme dont le rôle est si important dans la croissance et la différenciation morphologique des champignons nous apparaît déjà comme étant un processus physiologique relativement indépendant, ayant un siège, une direction générale centrifuge, un sens ou orientation variable en fonction de l'action du milieu, une intensité qui peut être modifiée.

Nous appuierons, dans les troisième et quatrième parties, ces constatations de données quantitatives montrant notamment les relations entre l'action du facteur azoté et l'action de l'aération sur la progression centrifuge du cytoplasme.

TROISIEME PARTIE

DE CHANGEMENTS METABOLIQUES CORRESPONDANT A DES MODIFICATIONS DE LEUR FORME, CHEZ QUELQUES CHAMPIGNONS, SOUS L'ACTION DU MILIEU.

INTRODUCTION

Nous avons vu, au cours de la deuxième partie de notre exposé, que des changements apportés systématiquement aux propriétés physiques et chimiques du milieu de culture provoquaient des modifications du " développement par rapport aux surfaces " en même temps que de la " progression centrifuge du cytoplasme ", le premier processus étant lié au second. En classant ces réactions morphologiques à l'action du milieu, nous remarquons :

- leur intensité très variable suivant les espèces.
- l'influence importante sur la morphogénèse de l'aération, de la nature et de la concentration de la source azotée.
- le rôle de l'entraînement (passé physiologique) et de l'état morphologique initial sur la différenciation morphologique.

Les recherches présentées dans la troisième partie ont pour but

- d'apporter une mesure de ces phénomènes ~~autant~~ que le permettent les moyens d'expérimentation habituels.
- d'approfondir l'étude de relations entre la croissance, la morphogénèse, le comportement physiologique et le métabolisme.

Nous avons recueilli, avec quelques champignons, un nombre limité d'indications quantitatives, mais essentielles, sur la croissance, les modifications chimiques tirées de l'analyse de l'organisme et du milieu. Nous faisons varier par contre assez largement les conditions expérimentales, ce qui d'ailleurs accroît la valeur et la portée de ces indications quantitatives. Ce genre de recherches est d'ailleurs d'autant plus difficile qu'il n'y a guère, chez les champignons, de travaux prenant leur point de départ dans des phénomènes morphologiques pour rechercher des changements correspondants dans le métabolisme.

Il faut remonter aux travaux de PASTEUR pour trouver une étude de l'action d'un même facteur, en l'occurrence une oxybiose très réduite, sur d'une part un phénomène physiologique : la fermentation alcoolique, sur d'autre part la forme. Depuis il y a eu floraison de travaux biochimiques sur la croissance, le métabolisme des glucides, de l'azote, des éléments minéraux; sur une fonction physiolo-

gique : respiration, fermentations, excréments diverses dans les milieux de culture; sur les synthèses : de protéines, de glucides, de lipides, de pigments, d'antibiotiques, de facteurs de croissance, sans compter l'énorme masse de travaux purement enzymologiques; mais les préoccupations biochimiques sont telles que, même lorsqu'elle est prise en considération, la question morphologique est traitée accessoirement. Par exemple HEIDE, puis RAAF, dans leurs recherches avec *ENDOMYCES VERNALIS* (*TRICHOSPORON PULLULANS*) démontrent, sur des prélèvements, l'existence d'enclaves lipidiques de plus en plus importantes avec le temps et en fonction de conditions de milieu favorisant la lipogénèse; mais, à vrai dire, on ne peut déduire de ces observations le mode de formation de ces enclaves. Nous avons repris l'étude de l'action morphologique de l'ensemble de ces facteurs favorisant la lipogénèse; nous constatons que ceux-ci provoquent une accentuation de la progression centrifuge du cytoplasme : de fins globules lipidiques y apparaissent qui sont à l'origine d'enclaves dans le cytoplasme résiduel d'éléments mycéliens plus âgés; on comprend alors pourquoi il y a abondance particulière des lipides dans les spores de conservation, observations déjà faites par BEIJERINCK, NIETHAMMER et alii. Naguère on se contentait de considérer la formation d'enclaves lipidiques comme une constitution de "substances de réserve" ou comme un signe de dégénérescence du cytoplasme vieillissant en raison, dans ce dernier cas, de la diminution de sa densité qui, nous le voyons, s'explique tout autrement par la progression centrifuge du cytoplasme. On voit par ce simple exemple qu'une connaissance plus approfondie de l'interdépendance des phénomènes morphologiques et biochimiques contribue à éclairer la nature physiologique de certaines synthèses, ici des lipides; il en est de même en ce qui concerne celle des pigments ou des antibiotiques.

Une autre considération intervient aussi dans une étude des rapports entre la morphogénèse et le métabolisme : à tout état morphologique nouveau correspondent de nouvelles propriétés physiologiques et possibilités métaboliques. Par exemple, *BLASTOMYCES DERMATITIDIS*, champignon parasite de l'homme, a une intensité respiratoire très différente sous son état levuriforme et sous son état mycélien (NICKERSON). Avec *PULLULARIA PULLULANS*, nous trouverons un comportement métabolique tout différent de sa forme mycélienne et de sa forme chlamydospores.

Après avoir exposé les techniques employées, nous examinerons l'influence, sur le métabolisme et la composition chimique de quelques champignons, de facteurs qui s'étaient révélés susceptibles de modifier leur morphogénèse : différences d'aération, nature de la source azotée, en particulier azote nitrique, restriction en azote du milieu de culture.

TECHNIQUES EMPLOYEES.A . PARTIE MICROBIOLOGIQUE .

Dans cette partie microbiologique, nous traitons les points suivants : choix des organismes, préparation des souches, ensemencement, préparation des milieux de culture, la culture elle-même.

I . Choix des organismes .

Notre choix se trouve être très limité du fait que, pour des recherches quantitatives, nous exigeons avec des organismes les qualités énumérées ci-dessous :

- possibilité de se développer sur milieux vraiment synthétiques à partir d'un ensemencement minime, même si ces milieux sont dépourvus de facteurs de croissance.

- capacité d'utiliser au moins une source azotée minérale pour les placer, au maximum, dans les conditions où ils ont à effectuer toutes leurs synthèses.

- développement habituel en surface des milieux liquides pour les raisons suivantes : emploi de milieux liquides, étude de la formation de voile et des processus d'immersion (évolution secondaire vers la profondeur du milieu).

- une forme aussi simple que possible au départ pour pouvoir mieux apprécier la différenciation morphologique. Cette dernière considération nous a fait rejeter l'emploi d'organismes déjà complexes tels qu'ASPERGILLUS NIGER, les FUSARIUM qui sont pourtant un matériel de choix pour certaines études biochimiques sur milieux synthétiques.

Parmi les organismes convenant le mieux à notre genre de recherches, nous avons retenu GEOTRICHUM CANDIDUM, CANDIDA HUMICOLA, PULLULARIA PULLULANS, HANSENULA ELLIPSOIDOSPORA qui sont des souches personnelles sauf CANDIDA HUMICOLA provenant de la collection de cultures de BAARN.

2 . Préparation des souches .a . Isolement .

Nos souches ont été isolées par la méthode bactériologique dite des " trois tubes " ; un prélèvement très faible d'une culture est dilué dans l'eau de condensation d'un premier tube de gélose inclinée et on étale cette eau une seule fois

et d'un seul mouvement à la surface de la gélose; le tube étant remis droit, on prélève un peu de son eau de condensation pour la diluer dans celle d'un deuxième tube que l'on incline, puis remet droit comme précédemment; on recommence pour un troisième tube, voire un quatrième. Quand une colonie est bien isolée, nous en faisons un prélèvement minime et nous répétons cet isolement.

b . Purification.

Elle a pour but de débarrasser les champignons des bactéries; LANGERON et GUERRA pratiquaient un passage de 10 jours ou deux de 5 jours en liquide de RAULIN; n'importe quel milieu acide convient; il y a surtout lieu de répéter la purification, car un examen microscopique négatif apporte une présomption et non une certitude.

c . Contrôle .

Nous vérifions les caractères morphologiques et biochimiques des souches par les techniques bactériologiques et mycologiques appropriées : examen direct dans l'eau, le Lugol (levures), le bleu coton lactophénol (additionné ou non de Soudan III, LANGERON) pour les champignons filamenteux; cultures sur lame; aspects sur milieux différentiels : CZAPEK-DOX que nous avons introduit en zymologie, à la craie, à l'alcool de STELLING -DEKKER, nos milieux au glycérol, au glyccolle, à la tyrosine, gélosés bruts sans addition d'azote, ces milieux étant solides ou liquides; épreuves de fermentation par la méthode de GUERRA améliorée; méthode auxanographique de BEIJERINCK suivant notre technique.

d . Conservation et repiquages .

Une fois les souches isolées et purifiées, contrôlées, définitivement étiquetées, au besoin suivant des lignées distinctes, nous les conservons sur milieux de SABOURAUD-LANGERON solide et liquide; nous sommes assez opposés en général à l'emploi et au passage sur des milieux très divers et très riches; pourquoi? parce que notre intérêt est toujours de disposer de souches faisant le maximum de synthèses; nous avons remarqué que l'emploi de milieux vitaminés affaiblit ce pouvoir de synthèse; souvent des souches provenant de collection manquent de " vitalité " (entendant par là une bonne croissance d'emblée sur milieux synthétiques " minima " il nous faut ensuite l'obtenir si c'est possible). D'autre part, ce sont des organismes robustes et il y a intérêt à les repiquer de loin en loin, car le nombre de mutations éventuelles est en relation avec le nombre de générations. Des repiquages sont utilisés au moment des expériences.

e . Entraînement .

Habituellement ce sont des repiquages qui servent. Assez souvent nous intercalons entre eux et l'ensemencement sur le milieu expérimental un passage sur un milieu particulier, notamment milieu glucosé sans azote pendant 15 jours ou plus.

3 . Ensemencement .

La question de l'ensemencement est l'une des questions techniques les plus importantes et les plus délicates :

- On doit considérer l'espèce comme une association symbiotique fréquente de lignées distinctes, elles mêmes évolutives, parmi lesquelles peut s'opérer une sélection physiologique; il faut, autant que possible par des examens morphologiques attentives, prévenir, en faisant soi-même cette sélection, cette cause de " variations spontanées de croissance sur milieux synthétiques " (BERAUD) et autres dont la constatation retient de plus en plus l'attention (WHITE).

- On doit ensemer des cultures jeunes de 48 à 96 heures; nous ne pouvons que confirmer les observations de H. LENORMAND suivant lesquelles il y a un minimum de cadavres cellulaires dans les cultures au 4ème jour; du 4ème jour, il y en a encore pratiquement pas d'après notre procédé de coloration à l'orseilline BB-bleu trypan qui fait apparaître les cellules mortes en bleu pâle.

- Le prélèvement doit être fait à la périphérie du thalle sans toucher la gélose dans le cas de cultures sur milieux solides.

Dans tous les cas, nous employons la même anse fine en boucle de 2 mm de diamètre.

En général, nous partons d'une culture jeune en milieu de S. BOURAUD-LANGERON liquide dans des tubes à essai de 18x18 remplis à 10 cm de hauteur; nous l'homogénéisons, nous en prélevons 4 anses que nous diluons bien en eau de robinet stérile dans des tubes de 18x18 remplis à 10 cm de hauteur; nous laissons une demi-heure en homogénéisant, puis nous ensemencions une anse de cette eau. D'autres fois, nous faisons un ensemencement direct, très faible, à partir d'une colonie. Les suspensions de chlamydozoaires sont prélevées à la pipette PASTEUR après homogénéisation.

Nous agitons vigoureusement les fioles ensemencées.

4 . Préparation des milieux de culture .

a . Récipients, bouchons.

Les récipients de culture sont des tubes de 25x25, des Erlenmeyer de 300 cm³, des boîtes de ROUX DE I l. Lavés, séchés, ils sont nettoyés au mélange sulfochromique, rincés très abondamment extérieurement et intérieurement, finalement avec de l'eau distillée. Les bouchons sont en coton cardé enveloppé de gaze; ils doivent coulisser librement dans les goulots, donc ils ne sont ni trop gros, ni trop hauts, ni trop serrés; ils sont préalablement autoclavés au dessus d'autres récipients pour en extraire ce qu'il y avait de substances facilement distillables; nous ne les flambons jamais.

b . Sterilisation .

Les récipients munis de leur bouchon sont stérilisés à 100°C pendant deux heures; les bouchons sont à peine blonds. L'ensemble est taré, rempli de milieu, taré à nouveau, stérilisé à l'autoclave suivant la technique de SABOURAUD en montant, dès vapeur fluente, de 100°C à 120°C en 20 minutes et en arrêtant ensuite. Les bouchons et le col du récipient ont été protégés par du papier sulfurisé déjà autoclavé. A toute nouvelle stérilisation, l'autoclave est lavé et son eau renouvelée, précautions sur lesquelles a insisté GAUTHERET à propos de la culture des tissus végétaux .

c . Aération ;

Il faut agiter fortement les milieux au sortir de l'autoclave et surtout le lendemain; nous agissons mécaniquement pendant une demie heure à raison de une secousse/seconde. Sans cette précaution fondamentale, nous avons constaté des différences importantes de récolte.

d . Préparation .

Les milieux sont préparés à partir de solutions mères. Nous employons le glucose pur et sa concentration initiale est vérifiée par dosage sur témoins stérilisés en même temps que les autres et tarés. Nous nous arrangeons pour avoir une concentration précise en azote au départ, généralement N/18,75 (74 mg 66 d'azote pour 100 cm³ de milieu); le dosage du sulfate d'ammonium est facile; celui de l'ion nitrique est très difficile et nous l'effectuons par épuisement d'un milieu témoin en retrouvant tout l'azote dans le champignon. La concentration en éléments minéraux pour un litre de milieu est la suivante : PO₄KH₂ 2,25 g - SO₄Mg 7 H₂O 1,125 g - SO₄Zn, SO₄Mn, Fe₂Cl₆, NaCl, CaCl₂ 0 g OIO de chaque -

SO_4Cu anhydre, $(\text{SO}_4)_3\text{Fe}_2 \text{O}$ 0 g 005 de chaque; ces substances sont introduites dans l'ordre : sulfates, chlorures, phosphates en agitant chaque fois pour éviter les précipitations. Nous homogénéisons avec un soin extrême le contenu de la fiole jaugée et nous répartissons à la pipette BAUDIN.

e . Substances fragiles et précautions générales.

Les substances fragiles telles que certains acides aminés sont stérilisées à part, éventuellement par tyndallisation. Elles sont rajoutées au restant du milieu avec toutes les précautions requises contre les risques de contamination. Nous ne pouvons en effet insister sur tous les petits procédés. Indiquons simplement que cette partie technique bactériologique, généralement traitée au second plan dans les travaux de recherches biochimiques, exige des méthodes aussi réglées, précises avec une application méticuleuse que le travail chimique. Dans nos expériences, il en est ainsi : nos souches sont pures, nous n'avons jamais eu de contaminations à aucun moment; nos milieux, non ensemencés, se conservent indéfiniment stériles; les sucres ne sont jamais altérés, etc...; chaque opération est minutieusement contrôlée, donc poursuivie avec la lenteur nécessaire.

5 . Culture .

Une fois les fioles ensemencées, nous les laissons à l'étuve et à l'obscurité; la température est réglée à 26°C . Chaque jour nous notons les modifications macroscopiques sans mobiliser les fioles. Nous ne saurions trop insister sur la nécessité d'examiner les cultures sans les bouger, de procéder aussi avec la plus grande douceur quand on ouvre et ferme la porte de l'étuve. Il suffit parfois d'un heurt insignifiant pour faire tomber un champignon qui se développait en surface et modifier alors tant sa croissance que son métabolisme. C'est une cause banale de variation de croissance, mais généralement méconnue et négligée, qu'on étiquete variation spontanée ou mutation alors qu'il s'agit d'une erreur technique.

Tous les échantillons, ainsi que les témoins, sont évidemment toujours en double, indépendamment de la nécessité de répéter les expériences, plusieurs fois même quand il s'agit d'un ordre de résultats entièrement nouveaux comme nous en exposerons; il faut aussi s'efforcer d'obtenir que toute expérience nouvelle serve au moins pour une partie de contrôle pour la précédente avec un organisme donné.

B . PARTIE CHIMIQUE .

Elle comprend la récolte et les déterminations chimiques.

I . La récolte .

Une fois la culture arrêtée, nous notons son aspect, nous faisons des frottis et éventuellement des ensemencements sur milieux usuels dans le but notamment de vérifier s'il y a eu sélection de lignée par voie physiologique ou si les caractères morphologiques liés aux conditions expérimentales de culture persistent un certain temps; c'est là un sujet que nous avons étudié, mais que nous ne développerons pas dans le présent travail; indiquons simplement que des substances toxiques créent effectivement une sélection physiologique de lignées résistantes ou même des mutations, que des milieux synthétiques expérimentaux très favorables (par exemple nitrate d'ammonium avec *HANSENULA ELLIPSOIDOSPORA*) au point de vue de la croissance ont développé au maximum la capacité de synthèse de ces organismes et leur magnifique croissance ultérieure sur milieux usuels en surface de ces milieux est un fait qui mérite d'être cité, car il justifie notre opinion, originale semble-t-il et en tout cas contraire à celle des zymologues et mycologues en général, qu'il ne faut pas entretenir les souches sur milieux riches, pléthoriques qui créent des troubles du métabolisme. Evidemment, ces repiquages à partir de milieux expérimentaux permettent de s'assurer en même temps qu'il n'y a pas eu de contamination, ce qui ne s'est jamais produit.

Une fois ces opérations terminées, nous pesons les fioles; il va de soi que l'on doit tenir compte de la perte d'eau par évaporation pour le calcul définitif de la concentration finale des constituants du milieu. Nous agitons ensuite fortement le milieu pour faire tomber le voile; et le fragmenter à l'extrême. Nous employons ensuite un autre petit procédé qui mérite également d'être cité : nous mettons les fioles à la glacière une demi-heure au moins; ceci ne cause qu'une perte d'eau insignifiante, mais complète la chute du voile et crée d'excellentes conditions de centrifugation pour les organismes dont le voile remonte (*HANSENULA* et *PICHLA* plus que *CANDIDA HUMICOLA*; centrifugation facile avec *GEOTRICHUM*)

Chaque centrifugation est faite à 2.500 tours pendant 6 minutes, la culture étant laissée à la glacière entre chacune et agitée juste avant de verser dans les tubes soigneusement tarés à la balance au 1/10 de mg. Tout le milieu est recueilli. Puis le culot est immédiatement remis en suspension avec de l'eau de lavage des fioles minutieusement nettoyées à l'aide d'un agitateur : trois lavages à l'eau distillée glacée sont nécessaires et on recueille cette eau. Ensuite, nous

pratiquons deux petites centrifugations de 2 - 3 minutes pour essorer le culot. Les tubes étant nettoyés extérieurement avec soin, nous pesons.

Nous obtenons ainsi le poids frais et ceci est obligatoire chaque fois que nous devons en faire des prises (réducteur total, lipides totaux, etc...), ce qui correspond à autant de pesées; évidemment dans ce cas, le matériel où on recueille ces prises est déjà taré; on vérifie directement et par différence, sans perdre de temps (évaporation).

Le poids sec est obtenu en laissant le poids frais ou une partie de celui-ci pendant 16 heures à l'étuve à 105°C. La teneur en eau du poids frais oscille autour de 80 p. 100; elle peut osciller entre 84 et 76 p. 100 suivant le champignon et suivant le milieu : par exemple HANSENULA ELLIPSOIDOSPORA est constamment plus riche en eau quand il est cultivé sur nitrate de sodium (80 %) que sur nitrate d'ammonium (75 %) sans que nous en connaissions la cause.

2 . Les déterminations chimiques .

Les achantillons, toujours en double ainsi que les témoins, font l'objet de récoltes et de déterminations séparées.

Les prises faites sur le milieu sont destinées

- au dosage du glucose suivant la méthode de SOMOGYI 1945 après défécation baryto-zincique : la différence entre le glucose des témoins non ensemencés et celui des échantillons donne évidemment le glucose consommé.

- au dosage de l'alcool suivant l'ancienne méthode de NICLOUX : oxydation par le mélange sulfochromique d'une prise convenable du distillat obtenu par l'appareil de rectification de SCHLOESING; le dosage doit être effectué en pleine lumière du jour.

- au dosage de l'ammoniaque déplacé par l'hydrate de magnésie dans un appareil de PARNAS-WAGNER; titrage par l'acide sulfurique N/10 ou N/20 en présence de deux gouttes de l'indicateur vert de bromocrésol-rouge de méthyle.

Enfin détermination électrométrique du pH du milieu.

Des parties aliquotes du poids frais sont destinées

- au dosage du réducteur total après hydrolyse des glucides cellulaires.
- à la détermination des lipides totaux après extraction à l'alcool bouillant dans l'appareil de KUMAGAWA-SUTO, détermination suivie de celle du phosphore lipidique, et, en certains cas, de celle des acides gras et de l'insaponifiable total. On détermine, en même temps, la " poudre sèche ", le " soluble-eau " dont l'addi-

tion à la valeur des lipides totaux reconstitué le "poids sec" que nous établissons aussi directement dans ces cas.

Les poids secs servent

- à la détermination de l'azote total après minéralisation (méthode de KJELDAHL).
- à celle du phosphore total suivant la méthode de THIVOLLE.

Toutes ces techniques ont reçu de nombreux perfectionnements de la part de MM CAHN et HOUGET qui nous les ont enseignées; donc nous ne les décrivons pas et renvoyons à leurs travaux. Nous nous sommes bornés à les appliquer en profitant de tous les petits procédés techniques qu'ils nous ont montrés et qui renforcent la valeur ainsi que le contrôle de ces méthodes.

La préparation du matériel, des solutions chimiques est longue et s'ajoute aux investigations expérimentales. Nous avons préféré multiplier le nombre de conditions expérimentales que celui des analyses dans un cas particulier, car l'essentiel était de placer l'ensemble des modifications métaboliques et de composition des organismes, d'ailleurs différents, dans un cadre assez vaste pour que ces modifications aient un sens physiologique et puissent être interprétées. Aussi, dans la plupart des cas, nous sommes nous bornés à établir le poids sec, son azote total, le glucose consommé, parfois nous avons fait toutes les déterminations indiquées ci-dessus. Il nous a paru commode, plutôt que de faire figurer des valeurs absolues dans nos tableaux, de rapporter les constituants au poids sec. D'ailleurs peu importe, on en déduit immédiatement les valeurs absolues et on peut les rapporter aussi à un autre paramètre dont peut être le plus intéressant, en dehors du poids sec, est l'azote total du champignon, ce qui donne une idée exacte de la quantité d'azote du milieu utilisée (complexe organisme-milieu) et du rendement de la protéogénèse approximativement.

RESULTATS EXPERIMENTAUX.

A . INFLUENCE DE L'AERATION.

I . Procédés d'étude .

Pour étudier l'influence de l'aération, nous employons des récipients de forme et de capacité variables, contenant une même quantité de liquide; nous obtenons ainsi des variations de la hauteur de la couche liquide, du rapport surface/volume (S/V) et de l'espace libre ou aérien surmontant le milieu. Nous utilisons:

- des tubes à essai de 25X25 contenant 50 cm³ de milieu; S/V 0,08 (a)
- des Erlenmeyer de 300 cm³ contenant 50 cm³ de milieu (S/V 1,1 et espace libre 250 cm³) (b) ou 100 cm³ (S/V 0,57 et espace libre 200 cm³) (c).
- des boîtes de ROUX de 1 l. contenant 100 cm³ de milieu (S/V 2,2 et espace libre 900 cm³) (d).
- des Erlenmeyer de 300 cm³ contenant 50 cm³ de milieu, agités ou non. (e)

Ces procédés ne donnent pas d'indications sur les modifications respiratoires, renseignent seulement sur les exigences en oxygène et sur la sensibilité des champignons à des différences d'aération. Ils offrent l'avantage de la simplicité, de la rapidité, de la possibilité de disposer, pour une même expérience, d'un grand nombre de fioles : 8 à 16, chaque échantillon étant en double. Ces essais comparatifs sur une assez grande échelle obvient partiellement aux inconvénients de cet obstacle expérimental majeur : la variation de croissance dont nous avons indiqué différentes causes : mutations, différences même légères dans le passé physiologique ou dans l'ensemencement, non aération préalable des milieux de culture, heurt léger de fioles en cours de culture, etc....

2 . Les différences de sensibilité à l'aération.

PULLULARIA PULLULANS, GEOTRICHUM CANDIDUM, CANDIDA HUMICOLA, SPOROPHORA TORULIFORMIS sont cultivés dans 50 cm³ de milieu en tubes à essai de 25X25 (a), donc dans les conditions d'aération les plus mauvaises. Ensemencement par dilution d'une culture récente. Durée de culture 7 jours. Le milieu renferme initialement 1.200 mg de glucose (M/7,5) et 37mg33 d'azote N/18,75) sous forme de sulfate d'ammonium que nous employons dans ces expériences et les suivantes où nous voulons mettre en évidence uniquement l'influence de l'aération. pH initial 3,9

TABLEAU I (Champignons divers)

	: Ps	: Gc/Ps	: Nt%Ps	: Pt%Ps	: pH	:
PULLULARIA PULLULANS	: 15,6	: 6,2	: 8,4	: 1,3	: 3,2	:
GEOTRICHUM CANDIDUM	: 45,6	: 4,6	: 5,7	: 0,9	: 2,8	:
CANDIDA HUMICOLA	: 52,8	: 4,0	: 5,8	: 1,2	: 2,7	:
SPOROPHORA TORULIFORMIS	: 47,2	: 2,8	: 5,5	: 1,3	: 2,9	:

(Ps = poids sec mg; Gc/Ps = glucose consommé mg sur poids sec mg; Nt%Ps = azote total ~~mg~~ % poids sec mg; Pt%Ps = phosphore total mg % poids sec mg)

Dans ces conditions d'aération très réduite, GEOTRICHUM CANDIDUM, CANDIDA HUMICOLA, SPOROPHORA TORULIFORMIS donnent une récolte analogue et environ trois fois plus forte que PULLULARIA PULLULANS dont la croissance est insignifiante.

Le rapport glucose consommé/poids sec (appelé aussi " consommation relative de glucose " et " taux de consommation du glucose ", rapport inverse du " rendement de croissance ") est beaucoup plus élevé chez ce dernier champignon, pourtant azymatique, que chez les autres; nous lui trouverons certainement cette valeur élevée.

Dans ce cas particulier de très mauvaise croissance, nous constatons que PULLULARIA PULLULANS présente une forte teneur en azote total et en phosphore total; nous trouvons un mycélium pur non extensif; peu à peu, au cours de cet exposé, nous dégagerons des rapports entre tendance extensive et teneur en azote.

Nous cultivons PULLULARIA PULLULANS dans de meilleures conditions d'aération dont l'une est nettement meilleure (agitation) : 50 cm³ de milieu dans des Erlenmeyer de 300 cm³ (b et e); ensemencement, durée de culture, composition du milieu sont les mêmes que précédemment :

TABLEAU 2 (PULLULARIA PULLULANS)

Agitation	: Ps	: Gc/Ps	: Nt%Ps	:
0	: 114,4	: 7,9	: 5,9	:
+	: 260,7	: 4,6	: 4,9	:

L'aération par agitation donne une récolte 2,3 fois plus forte et celle-ci, du fait de l'augmentation du rapport S/V (1,1 au lieu de 0,08), est déjà 7,4 fois plus forte sur Erlenmeyer non agités qu'en tubes à essai.

L'agitation fait s'abaisser considérablement le rapport glucose consommé/poids sec, constatation que nous ferons plus nettement encore par la suite, car ici avec les échantillons agités le glucose est épuisé .

L'agitation accroît l'utilisation de l'azote offert (à peu près doublée), mais provoque, en même temps, une diminution de la teneur en azote total du champignon dont la tendance extensive est accrue. Il se présente, comme précédemment, sous une forme mycélienne pure .

GEOTRICHUM CANDIDUM est cultivé dans les mêmes conditions :

TABLEAU 3 (GEOTRICHUM CANDIDUM)

Agitation	: Ps	: Gc/Ps	: Nt%Ps	:
0	: 163,9	: 4,5	: 6,2	:
+	: 171,7	: 4,5	: 6,5	:

La récolte, 3,7 fois plus forte qu'en tube à essai, n'est pas modifiée par l'agitation. La meilleure aération ne modifie pas non plus le rapport glucose consommé/poids sec, la quantité d'azote utilisée et la teneur en azote; parallèlement la forme est remarquablement fixe, la croissance étant autant intercalaire que centrifuge.

Avec le même organisme et dans les mêmes conditions, la durée de culture est ramenée à 4 jours au lieu de 7 :

TABLEAU 4 (GEOTRICHUM CANDIDUM)

Agitation	: Ps	: Gc/Ps	: Nt%Ps	:
0	: 112,9	: 3,7	: 6,5	:
0	: 114,2	: 3,4	: 6,3	:
+	: 113,0	: 3,8	: 6,7	:

La récolte vaut déjà les 2/3 de celle de 7 jours. Le rapport glucose consommé/poids sec est moindre et c'est un fait général que le " rendement de croissance " diminue avec l'âge des cultures. La teneur en azote est inchangée, ce qui atteste de la fixité de la forme en fonction du temps (différenciation d'emblée).

CANDIDA HUMICOLA est cultivé dans des conditions similaires, mais avec une concentration double en glucose du milieu et avec addition de 0 cm³ 25 par fiole d'eau de levures à 10 %. Durée de culture : 7 jours.

TABLEAU 5 (CANDIDA HUMICOLA)

Agitation	: Ps	: Gc/Ps	: Nt%Ps	:
0	: 296,5	: 4,6	: 4,7	:
+	: 302,2	: 4,0	: 4,8	:

Les récoltes sont beaucoup plus fortes que les précédentes et 5,7 fois plus qu'en tubes à essai. L'agitation ne modifie pas les récoltes, les taux de consommation du glucose, la quantité d'azote utilisée, les teneurs en azote. Sur fioles non agitées, il y a un voile membraneux; l'aspect microscopique est le même sur les fioles agitées : filamentisation précoce et importante.

Alors que une aération plus forte accroît la récolte pour PULLULARIA PULLULANS, GEOTRICHUM CANDIDUM et CANDIDA HUMICOLA trouvent déjà en ERLLENMEYER non agités des conditions d'aération optima; vu que ces conditions d'aération sont mé-

diocres et en considérant la quantité de glucose relativement importante consommée, on présume que l'intensité respiratoire est faible chez ces organismes; nous constatons par contre qu'ils font virer le vert Janus et même le rouge neutre, ce qui laisse penser qu'ils disposent d'un " pouvoir réducteur puissant ".

3 . Influence de l'entraînement et de la forme ensemencée .

a . Recherches avec PULLULARIA PULLULANS .

Comme nous venons de le voir, plus haut, ce champignon est le plus exigeant au point de vue aération et le plus sensible à ses différences : une diminution d'aération freine fortement sa croissance, élève la consommation de glucose, diminue l'utilisation de l'azote du milieu tout en augmentant la teneur en azote du champignon ; cette dernière constatation fait supposer que la restriction en oxygène ralentit bien d'autres synthèses encore que la protéogénèse.

D'autre part, en raison du polymorphisme de ce champignon, nous nous sommes demandé si les réactions à l'action de l'aération ne différaient pas d'une forme à l'autre. Nous confrontons, à ce point de vue, deux états distincts obtenus par des conditions de milieu et de culture opposées :

- état chlamydosporé : il est obtenu par ensemencement sur milieu glucosé sans azote d'une forme végétative quelconque; il se forme en profondeur d'autant mieux que le milieu est moins aéré et on obtient une masse mucilagineuse adhérente au fond du récipient, translucide, englobant des masses noirâtres qui sont des amas de chlamydospores; en 8 à 15 jours, on peut obtenir une récolte de 30-60 mg en poids sec à 1 % d'azote total (c'est la teneur minimum que nous ayons trouvée chez un champignon). Nous pouvons repiquer indéfiniment cet état chlamydosporé (C) sur milieu sans azote.

- état DEMATIUM : il est obtenu sur le même milieu, mais contenant suffisamment d'azote et bien aéré (D). C'est une forme de surface par opposition à la forme chlamydosporée qui est une forme profonde .

L'une et l'autre forme sont ensemencées, en boîtes de ROUX de 1 l., dans 100 cm³ de milieu renfermant 4.800 mg de glucose (M/3,75) et 74 mg 66 d'azote sous forme de sulfate d'ammonium. Durée de culture : 7 jours .

TABLEAU 6 (PULLULARIA PULLULANS)

Forme ensemencée	Ps	Gc/Ps	Nt%Ps	
Dematium (D)	584,3	5,4	4,8	
Chlamydospores (C)	423,5	7,0	5,0	

La croissance est inférieure et moins économique à partir de l'état chlamydospore profond au lieu de l'état DEMATIUM de surface; l'un et l'autre aboutissent cependant à un " état mycélien pur " habituel sur sulfate d'ammonium avec une même teneur en azote. Les différences de récolte s'expliquent en partie par le temps préalable de germination des chlamydospores. Il y a donc lieu de tenir compte surtout du rapport glucose consommé/poids sec plus élevé de la forme profonde. Cette expérience sera reprise avec le nitrate de sodium comme source d'azote et les différences se trouveront être considérablement accentuées.

b . Recherches avec CANDIDA HUMICOLA .

Ce champignon, peu exigeant au point de vue aération et peu sensible à ses différences, ne présente pas, comme PULLULARIA PULLULANS, des états morphologiques distincts. Cependant, nous opposons une forme de profondeur (p) obtenue sur milieu glucosé sans azote où son développement est insignifiant au fond du récipient, une forme de surface (s) formant un voile sur le même milieu, mais avec azote. Les deux formes sont ensemencées dans 100 cm³ de milieu ayant la même composition que précédemment, soit en boîtes de ROUX de 1L (d), soit en Erlenmeyer de 300 cm³ (c).
Durée de culture : 7 jours.

TABLEAU 7 (CANDIDA HUMICOLA)

Forme ensemencée	: S/V	: Ps	: Gc/Ps	: Nt%/Ps	:
de surface (s)	: 2,2	: 831,7	: 4,0	: 5,1	:
"	: 0,57	: 779,9	: 4,1	: 5,2	:
	: "	: 762,6	: 4,2	: 5,5	:
de profondeur (p)	: 2,2	: 839,0	: 3,7	: 4,4	:
"	: 0,57	: 980,4	: 3,6	: 4,8	:

Les récoltes sont les mêmes en boîtes de ROUX; par contre, en Erlenmeyer, elles sont très légèrement diminuées à partir de la forme (s) alors qu'elle est nettement augmentée de 16,7 % à partir de la forme (p) qui donne un rapport glucose consommé/poids sec et une teneur en azote un peu plus faibles. Donc l'entraînement en profondeur détermine une meilleure croissance de CANDIDA HUMICOLA quand le rapport S/V est ultérieurement le moins élevé. L'entraînement en profondeur entraîne au contraire toujours pour PULLULARIA PULLULANS une croissance ultérieure plus faible et moins économique.

B . INFLUENCE DE LA NATURE DE LA SOURCE AZOTÉE .

Nous avons montré, dans la seconde partie de notre exposé, que, à l'instar de l'aération, la nature de la source azotée peut modifier le " développement par rapport à la surface des milieux " et la " progression centrifuge du cytoplasme ".

Réservant à un chapitre spécial l'étude de l'influence de l'azote nitrique, nous examinons ici celles de peptones, de quelques acides aminés, du sulfate d'ammonium en opposant *PULLULARIA PULLULANS* et *CANDIDA HUMICOLA* dont nous avons observé les différences si nettes dans les réactions à l'action de l'aération.

Les peptones ont l'inconvénient d'être :

- une source azotée complexe en raison des nombreux groupes fonctionnels appartenant à des acides aminés différents.

- une source énergétique non négligeable par la partie non azotée de ces acides aminés, ce qui enlève évidemment une grande partie de sa signification au rapport glucose consommé/poids sec.

Nous ensemençons ces deux champignons en Erlenmeyer de 300 cm³ dans 50 cm³ de milieu (b) renfermant 1.000 mg de glucose et respectivement 0 g 5, 0 g 7 et 1 g de peptone (teneur en azote environ 16%), ce qui donne, en azote, une concentration du double au quadruple de celle de nos milieux habituels. Durée de culture : 4 jours.

TABLEAU 8 (*PULLULARIA PULLULANS*)

Concentration en peptone	Ps	Gc/Ps	Nt%Ps	Pt%Ps
1 %	126,4	3,4	7,0	1,3
1,4 %	163,7	3,4	7,2	1,3
2 %	151,8	3,5	7,8	1,4

TABLEAU 9 (*CANDIDA HUMICOLA*)

Concentration en peptone	Ps	Gc/Ps	Nt%Ps	Pt%Ps
1 %	94,7	2,1	10,1	1,8
1,4 %	181,7	2,1	9,8	1,6
2 %	277,8	1,8	9,6	1,7

- Dans le cas de *PULLULARIA PULLULANS*, la récolte est augmentée de environ 20 % aux deux concentrations supérieures en peptone. Le rapport glucose consommé/poids sec ne varie pas et reste plus bas qu'en présence de sulfate d'ammonium, mais continue de présenter une valeur particulièrement élevée en liaison probablement chez cet organisme avec une édification importante de membranes. Les teneurs en azote (environ 7) et en phosphore total (environ 1,3) sont élevées et fixes. Sur ces milieux, ce champignon donne une forme de surface *DEMATIUM*, mais non pigmentée, avec peu de mycélium, avec par contre beaucoup de spores.

- Dans le cas de *CANDIDA HUMICOLA*, la récolte est pratiquement doublée, puis triplée avec les concentrations croissantes en peptone. Le rapport glucose consommé/poids sec est fixe, d'une valeur de 2 (habituelle avec les champignons en présence de peptone et nous avons vu qu'on ne peut l'interpréter valablement puisque la peptone constitue en même temps un aliment ternaire). Les teneurs en azote (10 %) et en phosphore total (1,7 %) sont très importantes et les plus élevées que nous ayons rencontrées; cette constatation doit être rapportée au fait qu'il s'agit d'un organisme protéolytique; ces valeurs sont d'un tiers plus fortes que pour *PULLULARIA PULLULANS*. On obtient une forme de surface, blastosporée pure sans élongation.

Ces recherches avec les peptones furent des recherches préliminaires destinées à nous orienter dans la composition en glucose et en azote à donner à nos milieux synthétiques de façon que l'épuisement de l'une de ces substances ne soit pas trop rapide par rapport à celui de l'autre. Aussi est-ce dans des conditions toutes différentes que nous nous plaçons pour étudier l'action du sulfate d'ammonium et des acides aminés : leucine, méthionine, glycocolle. Notons que ceux-ci conservent l'inconvénient d'être des aliments ternaires en même temps qu'une source d'azote, ce qui rend difficile l'interprétation du rapport glucose consommé/poids sec. Les deux champignons précédents sont entraînés préalablement sur milieu glucosé sans azote pour éviter l'influence persistante et spécifique d'une source azotée déterminée. Nous les ensemençons en boîtes de ROUX de 1 L dans 100 cm³ de milieu renfermant 4.800 mg de glucose et 74 mg 66 d'azote sous forme de sulfate d'ammonium, de leucine, de méthionine, de glycocolle. Durée de culture : 7 jours pH initial 3,9.

TABLEAU IO (*PULLULARIA PULLULANS*)

Source azotée	: Ps	: Gc/Ps	: Nt%Ps	: Pt%Ps	: Nt/Pt	: pH	:
Glycocolle	: 76,8	: 4,3	: 3,3	: 0,7	: 4,7	: 3,9	:
Leucine	: 275,0	: 5,9	: 5,5	: 1,0	: 5,5	: 3,4	:
Méthionine	: 373,9	: 5,0	: 5,4	: 1,0	: 5,4	: 3,1	:
Sulfate d'ammonium	: 423,5	: 7,0	: 5,0	: 0,7	: 7,1	: 2,2	:

TABLEAU II (*CANDIDA HUMICOLA*)

Source azotée	: Ps	: Gc/Ps	: Nt%Ps	: Pt%Ps	: Nt/Pt	: pH	:
Méthionine	: 5.573	: 4,9	: 5,0	: 1,0	: 5,0	: 3,0	:
Sulfate d'ammonium	: 839	: 3,7	: 4,4	: -	: -	: 1,7	:
Glycocolle	: 956	: 3,3	: 5,6	: 1,7	: 3,3	: 4,5	:
Leucine	: 1.239	: 2,4	: 4,7	: 1,5	: 3,1	: 4,0	:

Avec *PULLULARIA PULLULANS*, les récoltes augmentent dans l'ordre : glycocolle (récolte très faible), leucine, méthionine, sulfate d'ammonium où elles valent respectivement 3,7 - 5 - 5,7 fois celles obtenues avec le glycocolle. Le rapport glucose consommé/poids sec, élevé, est indépendant de la valeur des récoltes et diminue dans l'ordre sulfate d'ammonium, leucine, méthionine, glycocolle; cet ordre a été trouvé pour diverses actions physiologiques d'acides aminés (BERAUD, ZELLER) mais sa signification ici ne peut être davantage précisée en raison du fait qu'il constitue en même temps un aliment ternaire. Les teneurs en azote (sauf pour le glycocolle) sont tout à fait similaires à partir de l'ensemencement de la forme chlamydosporée profonde (pratiqué ici) alors que l'importance de l'utilisation de la source azotée suit les récoltes et présente de grandes différences. Les rapports Nt/Pt, le pH varient très approximativement avec l'importance des récoltes. Sur sulfate d'ammonium on obtient une forme mycélienne pure. Sur leucine et méthionine, une forme DEMATIUM. Sur glycocolle un mélange de chlamydospores germées ou

Avec *CANDIDA HUMICOLA*, les récoltes augmentent dans l'ordre : méthionine où elle dépasse déjà la plus forte récolte obtenue avec *PULLULARIA PULLULANS*, sulfate d'ammonium, glycocolle, leucine où elles valent respectivement 1,5 - 1,7 - 2,1 fois celle faite sur méthionine. Le rapport glucose consommé/poids sec diminue avec l'importance de la récolte. L'utilisation de l'azote du milieu suit approximativement cette dernière. En effet, les teneurs en azote varient un peu et s'élèvent dans cet ordre particulier : sulfate d'ammonium, leucine, méthionine, glycocolle. La seule constatation morphologique intéressante est que l'élongation cellulaire diminue dans ce même ordre; il y a partout croissance en voile qui commence à s'immerger sur sulfate d'ammonium, qui est intense et grimpant sur leucine dont nous savons qu'il favorise sa formation chez les levures.

Le glycocolle mérite une mention à part; il n'est guère assimilé par *PULLULARIA*; avec *CANDIDA HUMICOLA*, il donne une forte récolte avec la teneur en azote total et en phosphore total la plus élevée; d'autres auteurs ont constaté que la teneur en azote total est constamment plus élevée avec le glycocolle quand il convient comme source d'azote (RAVEUX sur *ASPERGILLUS NIGER*, RAAF sur *ENDOMYCES VERNALIS*), nous même sur *SPOROPHORA TORULIFORMIS* et, avec J. MERY, sur *RUBROBACTERIOPSIS RUGOSA*. Nous avons insisté sur l'action morphologique de cette substance qui procure une croissance vraie importante, mais restreint la progression centrifuge du cytoplasme que l'on retrouve presque aussi abondant dans tous les éléments cellulaires et l'élongation cellulaire.

Nous ne ferons que citer d'autres recherches originales que nous avons pu

suivies avec des acides aminés en employant, à l'exclusion de tout aliment ternaire, soit un seul de ces acides, soit un mélange de deux ou trois d'entre eux. Ils peuvent se développer en présence d'alanine ou même de leucine seule, plus rarement d'acide glutamique ou d'acide aspartique seul, exceptionnellement de glycocolle. Les mélanges permettant un développement ne sont pas quelconques : tyrosine ou leucine + alanine conviennent très souvent, mais non par exemple tyrosine-glycocolle même si l'un et l'autre de ces acides aminés est assimilable. Dans ces recherches, nous avons utilisé des levures formant un voile et les résultats s'étendent à des bactéries aérobies : *SERRATIA MARCESCENS* et *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*.

C . INFLUENCE DE L'AZOTE NITRIQUE .

Le nitrate de sodium a l'avantage d'être

- une source azotée simple à l'inverse des peptones
- une source azotée minérale à l'inverse des acides aminés qui servent en même temps d'aliment ternaire.

- une source azotée bien supportée; avec le sulfate d'ammonium, il y avait une forte acidification du milieu et les modifications de pH se font fortement sentir sur la morphogénèse et le métabolisme; avec les organismes que nous avons choisis, avec la composition des milieux que nous avons adoptée, l'alcalinisation, conséquence normale de la libération de soude lors de la réduction de l'azote nitrique en azote aminé, ne s'observe guère; le pH peut s'élever légèrement, mais le milieu reste acide (pH 3,9 à 4,4 initialement); d'ailleurs, nous réduisons autant que possible la durée des expériences.

Par contre, à part les *Aspergillacés* et les *FUSARIUM*, peu de champignons utilisent facilement le nitrate de sodium. Nous avons pourtant abandonné l'idée d'expérimenter avec les premiers organismes, car ils sont déjà très différenciés et il est plus difficile d'établir d'emblée avec eux des relations entre la morphogénèse et le métabolisme. Nous utilisons *PULLULARIA PULLULANS* et *HANSENULA ELLIPSOIDOSPORA* dont la différenciation morphologique augmente nettement avec l'aération; de plus, nous pourrions montrer chez eux l'influence de l'adaptation à la vie aérobie dans l'utilisation de l'azote nitrique; c'est là, semble-t-il, une manière nouvelle d'examiner le problème de cette utilisation et elle donne des résultats qui dépassent, par leur portée, cette seule question .

I . Recherches sur PULLULARIA PULLULANS.

Nous avons précédemment comparé les réactions à l'action de l'oxygène des deux formes : chlamydosporée profonde et DEMATIUM de surface, de ce champignon; nous poursuivons cette comparaison non plus en présence de sulfate d'ammonium, mais de nitrate de sodium, en adjoignant à cette expérience une troisième forme (N) obtenue par entraînement sur milieu nitrate de sodium-glucose de la forme DEMATIUM. Les conditions de culture sont les mêmes que celles se rapportant au tableau 6 dont nous rappelons les indications; nous montrons en même temps les résultats obtenus avec la méthionine :

TABLEAU I2 (PULLULARIA PULLULANS)

Source azotée	: Forme ensemencée :	Ps	: Gc/Ps	: Nt%Ps	:
Nitrate de sodium	: D	: 651	: 7,2	: 4,3	:
"	: N	: 414	: 6,9	: 4,2	:
"	: C	: 189	: 10,2	: 5,4	:
Sulfate d'ammonium	: D	: 584	: 5,4	: 4,8	:
"	: C	: 424	: 7,0	: 5,0	:
Méthionine	: D	: 604	: 5,4	: 3,9	:
"	: C	: 374	: 5,0	: 5,4	:

Nous comparons d'abord les récoltes obtenues à partir de chacune des formes initiales en fonction de la nature de la source azotée. Elles sont analogues avec la forme DEMATIUM (D) ; elle est cependant un peu plus forte en présence de nitrate de sodium. La forme chlamydosporée donne des récoltes moindres, similaires sur sulfate d'ammonium et sur méthionine, mais deux fois plus faible, par rapport à ces sources azotées, sur nitrate de sodium; c'est donc l'inverse de ce qui est observé, dans ce cas, avec la forme DEMATIUM.

Nous comparons ensuite, pour une même source azotée, les différences de récolte en fonction de la forme DEMATIUM ou chlamydozoïdes : avec cette dernière, elle est respectivement 1,4 - 1,6 - 3,4 fois moindre en présence de sulfate d'ammonium, de méthionine, de nitrate de sodium. La différence est donc maxima en présence d'azote nitrique; on peut en déduire que la forme chlamydosporée profonde obtenue dans des conditions particulières et notamment de faible aération n'est pas adaptée à utiliser l'azote nitrique; il apparaît en même temps que l'azote nitrique sensibilise au maximum le champignon à l'action de l'oxygène; nous verrons comment on peut tirer parti expérimentalement de cette action qui semblait, jusqu'ici, ignorée.

Nous avons vu que le rapport glucose consommé/poids sec est extrêmement élevé

chez PULLULARIA PULLULANS pour un organisme azymatique; ceci est lié en partie à l'édification importante de membranes. Examinons d'abord, comme nous l'avons fait pour les récoltes, le rapport glucose consommé/poids sec pour chacune des formes en fonction de la nature de la source azotée. Avec la forme DEMATIUM, sa valeur est la même en présence de sulfate d'ammonium et de méthionine, mais elle est d'un tiers plus élevée en présence de nitrate de sodium. Avec la forme chlamydosporée il y a des différences beaucoup plus marquées; elle est, par rapport au sulfate d'ammonium, 1,4 fois moindre sur méthionine et 1,4 fois plus élevée en présence de nitrate de sodium.

Si on examine ensuite, pour une même source azotée, le rapport glucose consommé/poids sec en fonction de la forme, on trouve, pour la forme chlamydosporée et en présence d'une source azotée minérale, une valeur beaucoup plus élevée que pour la forme DEMATIUM, d'un tiers qu'il s'agisse de sulfate d'ammonium ou de nitrate de sodium. Or une valeur élevée du rapport glucose consommé/poids sec est précisément ce qui s'observe quand le champignon est cultivé dans des conditions d'aération restreinte (voir tableau 2).

L'observation précitée s'applique également aux teneurs en azote; celles-ci sont nettement plus élevées avec la forme chlamydosporée et de même valeur quelle que soit la source azotée.

Tout ceci concourt à établir que la forme chlamydosporée est nettement moins "aérobie" que la forme DEMATIUM et que l'azote nitrique, sensibilisant le champignon à l'action de l'oxygène, accentue les différences de métabolisme et de composition chimique à partir des deux formes.

Au point de vue morphologique, l'ensemencement de l'état DEMATIUM reproduit un état DEMATIUM sur méthionine et sur nitrate de sodium, donne un état mycélien pur sur sulfate d'ammonium. L'ensemencement de chlamydosporées donne un état qui tend vers les précédents : état DEMATIUM avec moins de mycélium sur méthionine, état mycélien sur sulfate d'ammonium. L'évolution est toute autre en présence de nitrate de sodium que cette forme chlamydosporée de profondeur est mal adaptée à utiliser : le développement en surface est alors faible, il n'y a pas de pigmentation et nous trouvons, en suspension dans le milieu, un mélange de chlamydosporées germées ou non, de courtes chaînes cellulaires arthrospores ou bourgeonnantes; il y a là un véritable état de "réduction morphologique".

En partant de l'état DEMATIUM (N), nous pouvons faire une observation complémentaire : la récolte est environ une fois et demie moindre qu'à partir de l'état (D); cependant le taux de consommation de glucose, la teneur en azote, l'as-

pect morphologique sont similaires. Il semble qu'on puisse attribuer la différence de récolte à l'absence ou à la diminution de facteurs de croissance qu'apporte l'ensemencement d'une souche préalablement cultivée sur milieu peptone-glucose.

En résumé, les expériences précédentes font ressortir deux ordres de faits :

- il y a adaptation à l'utilisation de l'azote nitrique en fonction des conditions de vie antérieure plus ou moins *aérobie* : la forme *chlamydosporée* profonde garde des caractères de champignon cultivé en faible aération et est mal adaptée à utiliser l'azote nitrique.

- le nitrate de sodium sensibilise le champignon à l'action de l'oxygène.

Nous discuterons ultérieurement la signification générale du fait que le rapport glucose consommé/poids sec est constamment plus élevé en présence d'azote nitrique que de toute autre source azotée; indiquons déjà que dans le cas présent l'excès de glucose consommé ne se rapporte pas à la nécessité de fournir une quantité d'énergie supplémentaire destinée à permettre la réduction de l'azote nitrique en azote aminé.

2 . Recherches avec HANSENULA ELLIPSOIDOSPORA .

HANSENULA ELLIPSOIDOSPORA est le type même de levure " haute ou respiratoire ". Classiquement les levures hautes sont des levures formant un voile et faisant fermenter le raffinose un tiers, c'est à dire ne faisant pas fermenter le mélibiose. Cette conception doit être élargie et nous appelons " levure haute à caractéristiques complètes " celle qui, comme HANSENULA ELLIPSOIDOSPORA, présente les caractères suivants : formation précoce d'un voile important, utilisation facile comme seul *élément* énergétique de produits, généralement de la fermentation alcoolique, tels que l'alcool éthylique, le glycérol, des acides tels que l'acide succinique, etc..., l'acide acétique, utilisation éventuelle de la tyrosine, fermentation du raffinose un tiers, production d'éthers dont nous remarquons avec HANSENULA qu'elle est favorisée par l'aération.

Contrairement à PULLULARIA PULLULANS qui " asphyxie " littéralement quand l'aération est faible HANSENULA ELLIPSOIDOSPORA supporte des diminutions importantes d'aération. Par contre, nous avons le désavantage d'un pouvoir fermentaire qui gêne l'interprétation du rapport glucose consommé/poids sec auquel se rapportent également la respiration, la croissance et les différentes synthèses telles que celles de glucides ou de lipides cellulaires et de substances excrétées dans le milieu. Il est prouvé une fois de plus qu'il est nécessaire d'examiner un

phénomène morphologique, physiologique ou métabolique avec divers organismes pour en connaître les aspects. Ainsi, il est difficile d'examiner le problème du métabolisme de l'azote nitrique chez les champignons en s'appuyant sur le seul exemple d'*ASEPRGILLUS NIGER* comme on semble l'avoir fait jusqu'ici.

a. Influence de l'aération sur l'utilisation de l'azote nitrique.

Nous ensemençons une anse d'une culture récente sur milieu de SABOURAUD-LANGERON incliné dans 100 cm³ de milieu soit en boîtes de ROUX de 1 L, soit en Erlenmeyer de 300 cm³. Le milieu renferme initialement 7.500 mg de glucose (M/2,4) et 74 mg 66 d'azote (N/18,75) sous forme de nitrate de sodium ou de sulfate d'ammonium. Durée de culture : 3 ou 4 (°) jours. pH initial 3,9.

TABLEAU I3 (*HANSENULA ELLIPSOÏDOSPORA*)

Source azotée	: S/V	: Ps	: Gc/Ps	: Nt%Ps	: pH	:
Nitrate de sodium	: 0,57	: 279	: 7,9	: 6,7	: 4,7	:
"	: 2,2	: 764	: 8,4	: -	: 4,0	:
Sulfate d'ammonium	: 0,57	: 250	: 8,5	: 7,6	: 2,2	:
" (°)	: 0,57	: 291	: 10,6	: 7,2	: 2,2	:
" (°)	: 2,2	: 281	: 10,0	: 7,5	: 2,1	"

Avec le nitrate de sodium, la récolte devient deux fois et demie plus forte quand l'aération augmente avec développement d'un voile grimpant et plissé. Sur sulfate d'ammonium, la récolte n'est pas augmentée; il y a production d'un voile qui tend rapidement à s'immerger. Le rapport glucose consommé/poids sec est plus élevé en présence de sulfate d'ammonium. Celui-ci donne une teneur en azote plus forte avec peu d'élongation cellulaire.

Ces différences s'accroissent encore quand on prolonge la durée de l'expérience. Sur sulfate d'ammonium, la croissance est freinée par l'acidification du milieu, mais le champignon reste vivant et continue d'utiliser le glucose de sorte que le rapport glucose consommé/poids sec atteint des valeurs de 15 - 16 au 7ème jour. Le voile s'immerge, il n'y a pas d'élongation cellulaire pratiquement et la teneur en azote des récoltes reste élevée. Dans les mêmes conditions avec le nitrate de sodium, la récolte, au contraire, augmente, mais plus lentement en raison de l'insuffisance d'aération avec les Erlenmeyer, le rapport glucose consommé/poids sec ne s'élève pas, la teneur en azote diminue et l'élongation cellulaire s'accroît.

Ces résultats nous ont conduit à utiliser une autre source azotée ammoniacale

pour l'opposer au nitrate de sodium et nous avons adopté le nitrate d'ammonium. Les conditions de milieu et de culture sont les mêmes que précédemment :

TABLEAU I4 (HANSENULA ELLIPSOIDOSPORA)

Source azotée	: S/V	: Ps	: Gc/Ps	: Nt%Ps	: pH
Asparagine	: 0,57	: 622	: 7,0	: -	: 3,1
Nitrate de sodium	: 0,57	: 266	: 8,1	: 6,6	: 4,0
Sulfate d'ammonium	: 0,57	: 250	: 9,0	: 7,6	: 2,4
Nitrate d'ammonium	: 0,57	: 387	: 9,0	: 7,5	: 2,6
	: 2,2	: 884	: 6,9	: 7,7	: 3,1

Nous citons des valeurs obtenues avec l'asparagine parce qu'elles donnent une idée de la récolte maxima qu'on peut obtenir avec HANSENULA en Erlenmeyer; elle dépasse de loin celles obtenues avec des sources azotées minérales.

Nous remarquons immédiatement que le nitrate d'ammonium est une source azotée toute différente du sulfate d'ammonium. Il donne même une récolte une fois et demie plus forte que le nitrate de sodium en Erlenmeyer; donc une aération limitée freine moins la croissance en présence de nitrate d'ammonium que de nitrate de sodium; c'est là un résultat particulièrement important parce qu'il s'en déduit qu'il faut davantage d'oxygène pour permettre l'utilisation de l'azote nitrique que de l'azote ammoniacal ou aminé par cette levure; c'est aussi un résultat surprenant parce que, l'utilisation de l'azote nitrique se faisant par réduction, elle ne devrait pas nécessiter une aération plus forte et l'azote nitrique pourrait même théoriquement servir de source d'oxygène.

Le tableau montre encore que, avec le nitrate d'ammonium, la récolte est augmentée 2,3 fois quand le rapport S/V passe de 0,57 à 2,2, cette augmentation étant analogue à celle trouvée avec le nitrate de sodium.

Cependant, cette nouvelle source azotée présente avec ce dernier des différences notables dans cette expérience

- le rapport glucose consommé/poids sec est nettement abaissé par une meilleure aération;
- la teneur en azote est aussi élevée qu'en présence de sulfate d'ammonium et en effet l'élongation cellulaire est faible par rapport au nitrate de sodium alors que le voile est important et plissé.

b. Influence de l'ammoniaque sur l'utilisation de l'azote nitrique

L'emploi du nitrate d'ammonium fait donc, comme celui du sulfate d'ammonium, augmenter la teneur en azote de HANSENULA, mais il acidifie moins le milieu et

son utilisation est accrue, comme pour le nitrate de sodium, par une meilleure assimilation. En somme ses caractères d'utilisation participent de ceux de l'azote nitrique et de ceux de l'azote ammoniacal. Ceci ne peut s'expliquer que par une assimilation simultanée, chez cette levure, de l'une et de l'autre forme d'azote, ce qui ne semble avoir été rencontré chez aucun autre champignon (chez *PULLULARIA* et *PELLULINUS* il y a assimilation successive de l'azote ammoniacal, puis de l'azote nitrique). Nous vérifions le fait en effectuant des dosages d'ammoniaque dans le milieu où il y a eu culture et dans le milieu témoin; la différence nous donne l'azote ammoniacal disparu du milieu et utilisé par le champignon; en retranchant cette dernière valeur de celle de l'azote total du champignon, nous obtenons la quantité d'azote nitrique utilisée. Résultat : il y a presque autant d'azote nitrique utilisé que d'azote ammoniacal alors même que le milieu n'est pas épuisé en ammoniaque. Il y a donc chez cette levure assimilation simultanée de l'azote ammoniacal et de l'azote nitrique qui doit pourtant être réduit.

Cette constatation surprenante conduit à se demander si l'ammoniaque, produit du métabolisme de l'azote nitrique (rencontré, de même que les nitrites, à l'état de traces, quand il y a une concentration initiale élevée en nitrate), ne favorise pas la réduction biologique de l'azote nitrique. Ce serait là un bel exemple de produit d'un métabolisme intervenant, dans des conditions physiologiques, sur le métabolisme de son produit originel. Pour vérifier cette hypothèse, nous ajoutons de très faibles quantités d'ammoniaque à un milieu dont la source d'azote de base reste le nitrate de sodium. L'ensemencement est fait par dilution (environ mille fois plus faible que précédemment) afin d'éviter un apport même minime d'azote. La culture est faite en Erlenmeyer de 300 cm³ contenant 100 cm³ de milieu renfermant 7.500 mg de glucose (M/2,4) et 74 mg 66 d'azote (N/18,75) sous forme de nitrate de sodium. Le sulfate d'ammonium est ajouté aux concentrations M/2.400 (1 mg 16 d'azote), M/1.200 (2 mg 33), M/600 (4 mg 66). Durée de culture : 4 jours. pH initial 3,9.

TABLEAU 13 (*HANSENULA ELLIPSOIDOSPORA*)

Quantité initiale :	Ps	Gc/Ps	Nt%Ps	Gain en	Supplément d'azote:	pH :
Ammoniaque :	:	:	:	Ps :	Nt : nitrique utilisé :	:
0	: 285,2	: 7,8	: 5,84	:	:	: 4,0 :
1 mg 16	: 383,9	: 7,4	: 6,03	: 98,7	: 6,513 :	5,347 : 4,0 :
2 mg 33	: 401,2	: 7,34	: 6,07	: 116,0	: 7,538 :	5,195 : 4,0 :
4 mg 66	: 478,9	: 7,59	: 6,07	: 193,7	: 12,47 :	7,804 : 4,0 :

La récolte est accrue respectivement de 34,6 - 40,7 - 68 p. 100 par rapport

aux témoins sans cependant que la quantité de glucose consommé pour obtenir un même poids sec soit modifiée.

En valeurs absolues et par rapport aux témoins (0), en admettant que l'azote ammoniacal a été entièrement consommé, la levure a fixé, sous son influence, un surplus d'azote d'origine nitrique : 5,34 - 5,19 - 7,80 mg; il n'y a pas proportionnalité entre ces valeurs et les quantités : 1,16 - 2,33 - 4,66 mg d'azote ammoniacal initiales du milieu. On se trouve donc en présence d'un cas typique où, dans des conditions physiologiques (où il y a en même temps croissance), un produit du métabolisme favorise l'assimilation de son produit originel. Nous donnerons ultérieurement un autre exemple d'un tel processus physiologique in vivo; bien qu'il ne semble pas avoir été reconnu jusqu'ici, il paraît être général et on pourrait le définir ainsi : en dehors de phénomènes d'équilibre biochimique établis par les travaux d'enzymologie, mais probablement par l'intermédiaire de ces derniers, tout produit d'un métabolisme peut agir, par récurrence, sur le métabolisme de son produit d'origine en créant de nouvelles conditions à ce métabolisme. Nos investigations sont trop limitées pour que nous osions donner à cette proposition une forme de loi, mais ce principe de récurrence convient parfaitement dans le cas de cultures de microorganismes où les conditions physiologiques dans lesquelles s'exercent les actions métaboliques sont constamment modifiées et interviennent d'une façon constamment nouvelle sur le métabolisme lui-même.

Quelles sont ici les modifications des conditions physiologiques ? Nous les trouvons immédiatement en examinant le tableau I5 et en se référant au tableau I4. L'utilisation de l'azote nitrique en Erlenmeyer est freinée par l'insuffisance d'aération : " effet limitant " de cette insuffisance qui freine également la croissance pondérale. Or l'addition de traces d'ammoniaque agit comme si on déplaçait cet effet limitant, comme si on le reculait, car elle favorise l'utilisation de l'azote nitrique comme le ferait une meilleure aération. C'est là déjà un exemple d'action physiologique convergente sur deux processus : la croissance, l'utilisation de l'azote nitrique, action commune à deux facteurs : une meilleure aération, l'intervention de traces d'ammoniaque, entièrement distincts.

Les résultats sont les mêmes si on substitue au sulfate d'ammonium le nitrate d'ammonium; ils sont encore plus accentués quand on augmente la concentration en azote nitrique du milieu.

Le voile apparaît partout au bout de 36 heures, mais il augmente avec une concentration croissante en ammoniaque sans cependant qu'il y ait de modifications microscopiques appréciables.

c . Influence de la forme ensencée sur l'utilisation de l'azote nitrique .

Nous comparons à la forme habituelle (h) employée jusqu'ici une forme que nous appelons voile (v) parce qu'elle est obtenue, par sélection physiologique, à partir d'un voile indéfiniment persistant au dessus d'un milieu liquide épuisé.

Nous ensemençons, par dilution, ces deux formes en boîtes de ROUX de 1 L dans 100 cm³ de milieu renfermant comme précédemment 7.500 mg de glucose et 74 mg 66 d'azote soit sous forme de nitrate de sodium, soit sous forme de nitrate d'ammonium. Durée de culture : 4 jours.

TABLEAU XVI (*HANSENULA ELLIPSOIDOSPORA*)

Source : Forme : Ps : Gc/Ps : Nt%Ps : Rt%Ps : Lt%Ps : Pl%Ps : Alc%Ps :
azotée : initiale:

NO ₃ Na	: h	: 605	: 7,7	: 6,4	: 32,2	: 10,3	: 0,154	: 56,5	:
"	: v	: 724	: 5,7	: 7,0	: 39,6	: 9,7	: 0,134	: 38,8	:
"	: v	: 719	: 5,1	: 7,2	: 39,0	: 9,1	: 0,149	: 16,3	:
NO ₃ NH ₄	: h	: 884	: 6,9	: 7,7	: 34,6	: 6,1	: 0,108	: 96,0	:
"	: v	: 1.135	: 4,4	: 6,6	: 35,9	: 9,7	: 0,120	: 15,4	:
"	: v	: 1.116	: 4,1	: 6,8	: 38,8	: 9,0	: 0,112	: 18,1	:

(Nous rapportons au poids sec, non seulement le glucose et l'azote total, mais le réducteur total Rt%; les lipides totaux Lt%; le phosphore lipidique Pl%; l'alcool éthylique Alc%).

Nous comparons d'abord les résultats obtenus avec la forme normale ou habituelle (h) de cette levure en fonction de la source azotée :

- le nitrate d'ammonium donne une récolte 1,46 fois plus forte avec un rendement 1,11 fois meilleur, avec une teneur en azote 1,2 fois plus élevée (malgré la forte croissance en voile, l'élongation cellulaire est moindre)

- la teneur en réducteur total est un peu plus élevée, mais celle en lipides totaux environ 1,7 fois moindre; ceci appelle une remarque, car cette différence s'amenuise quand on compare les teneurs en acides gras : respectivement 3,15 % Ps et 3,75 % Ps avec le nitrate de sodium et le nitrate d'ammonium, mais reste importante quand on considère les insaponifiables en % Ps, respectivement 1,234 % Ps et 0,845 % PS. La teneur en phosphore lipidique est 1,4 fois moindre en présence de nitrate d'ammonium. Il y a donc un changement très important de composition de l'organisme suivant qu'il est cultivé sur l'une ou l'autre source azotée : augmentation de la teneur en réducteur total et diminution de celle en lipides totaux ainsi qu'en phosphore lipidique avec cette forme normale en présence de nitrate d'ammoniaque par rapport au nitrate de sodium; cette différence est à rapprocher

de celle de la teneur en azote total et aussi, du point de vue du métabolisme du glucose, de la production d'alcool rapportée au poids sec.

- cette production d'alcool en % du poids sec est 1,7 fois plus forte en présence de nitrate d'ammonium.

Les réactions de la forme " voile " (v) sont tout à fait différentes :

- d'abord sa croissance est plus forte que celle de la précédente : 1,2 fois en présence de nitrate de sodium, plus de 1,7 fois en présence de nitrate d'ammonium; le voile apparaît plus précocément.

- le rendement de croissance est beaucoup plus économique, respectivement 1,35 et 1,57 fois.

- la teneur en azote 1,1 fois plus forte en présence de nitrate de sodium est 1,15 fois moindre en présence de nitrate d'ammonium; donc à ce point de vue l'évolution est inversée par rapport à la forme normale.

- les teneurs en lipides totaux sont les mêmes sur les deux sources azotées et du même ordre que celle, maximum, trouvée en présence de nitrate de sodium avec la forme normale. Cependant, comme pour celle-ci, le taux de phosphore lipidique est plus faible en présence de nitrate d'ammonium, environ 1,2 fois.

- la production d'alcool en % Ps est considérablement diminuée, de moitié en présence de nitrate de sodium, plus de 5,5 fois moindre en présence de nitrate d'ammonium.

En somme, cette forme " voile " constitue nettement une " lignée distincte " obtenue par voie de sélection physiologique; elle est caractérisée par.

- une croissance plus précoce et rapide

- des réactions métaboliques entièrement différentes : rapport glucose consommé/poids sec beaucoup plus bas et production d'alcool très restreinte, ce qui fait penser qu'il s'agit d'une " forme plus aérobie ".

- une composition chimique très différente après culture tant sur nitrate de sodium que de nitrate d'ammonium et présentant moins de différence suivant la source azotée que la forme normale.

- enfin, on remarque, avec cette forme (v) " plus aérobie ", une utilisation plus forte de l'azote nitrique et ceci confirme les relations si importantes entre l'aération, l'adaptation à l'utilisation de l'azote nitrique en fonction de la forme ensemencée, apparues nettement dans le cas de *PULLULARIA PULLULANS*.

Pour compléter l'étude de cette forme " voile ", nous la cultivons en Erlenmeyer au lieu de boîtes de ROUX, les conditions de milieu, de durée étant les mêmes que précédemment :

TABLEAU I7 (HANSENULA ELLIPSOIDOSPORA)

Source :	Forme :	Ps :	Gc/Ps :	Nt/Ps :	Rt/Ps :	Lt/Ps :	Pl/Ps :	Alc/Ps :	pH :
azotée :	initiale :								
NO ₃ Na :		289 :	5,5 :	7,3 :	37,4 :	8,9 :	0,158 :	20,9 :	3,1 :
NO ₂ NH ₄ :	v	596 :	4,4 :	7,2 :	35,0 :	7,0 :	0,082 :	34,0 :	2,4 :

La comparaison avec le tableau précédent montre qu'une aération moindre fait diminuer la récolte plus fortement (60 %) en présence du nitrate de sodium que de nitrate d'ammonium (47 %); le rapport glucose consommé/poids sec est légèrement augmenté. Les teneurs en azote sont légèrement plus fortes. Les teneurs en réducteur total sont un peu moindres. Celle en lipides totaux est nettement diminuée en présence de nitrate d'ammonium. De même celle en phosphore lipidique alors qu'elle est légèrement augmentée en présence de nitrate de sodium. La production d'alcool en % Ps est nettement augmentée en présence de nitrate d'ammonium. Ainsi la diminution d'aération oppose davantage ces deux sources azotées avec la forme (v) de HANSENULA et montre, en présence de nitrate d'ammonium, qu'elle restreint la lipogénèse et augmente la production d'alcool.

D. INFLUENCE DE LA RESTRICTION EN AZOTE DU MILIEU DE CULTURE

Il semble nous revenir d'avoir, les premiers, constaté et étudié l'action de la restriction en azote du milieu sur la morphogénèse des champignons, nous l'avons examinée avec quelques détails dans la seconde partie de notre exposé ; nous avons dit qu'elle était le facteur provoquant le plus constamment l'immersion dans les milieux de culture, comme si le champignon devait se soustraire à l'action de l'oxygène; nous avons vu que, freinant la protéogénèse et la multiplication cellulaire, elle favorisait par contre hautement la tendance extensive, la progression centrifuge du cytoplasme et l'élongation cellulaire, inversant d'après ce que nous venons de dire, l'orientation de la progression centrifuge du cytoplasme par rapport à son sens au cours du développement d'un appareil sporifère aérien, s'opposant donc à ce développement et également à la formation ou, au moins, à la persistance d'un voile chez les levures.

Toutefois, on doit définir ce qu'on entend par restriction en azote. Il peut s'agir soit d'une faible quantité initiale et vite épuisée d'azote du milieu, soit d'une faible concentration en azote du milieu, la teneur en aliment ternaire du milieu restant constante. Il faut distinguer la restriction en azote d'un déséquilibre azote-carbone (rapport N/C) qui peut être faible même avec un milieu où la

quantité d'azote est suffisante et aussi d'une diminution de la concentration en azote, le rapport N/C demeurant constant.

Le cas le plus extrême est celui de milieux sans azote avec lesquels nous avons pu observer le développement spontané en profondeur de champignons paraissant être faiblement aérobies; il s'agit, nous l'avons vu, d'une apparence de développement due à des phénomènes de gonflement et à la production de mucilage. Nous avons reproduit expérimentalement ces faits avec des *Dématiées* et on est étonné des possibilités d'adaptation de ces organismes notamment à des conditions de vie confinant à l'autotrophie; cependant les quantités d'azote trouvées dans ces champignons sont inférieures à un mg et rien n'autorise à émettre l'hypothèse d'une " fixation d'azote "; il en est probablement de même pour les nombreux cas de " fixation d'azote " par les champignons que l'on a décrits, car les quantités considérées comme fixées sont véritablement trop faibles. Finalement, ce qui nous paraît devoir être retenu, c'est la constance avec laquelle, en l'absence d'azote dans le milieu, ces champignons, tous azymatiques pourtant, vivent dans sa profondeur, c'est la fréquence aussi avec laquelle ils se présentent sous leur forme " spores de conservation ", notamment dans le cas de *Dématiées*.

Si les apparences de développement dans les milieux de culture sans azote méritent cette mention, la question la plus importante, à notre avis, dans le cadre d'une étude des rapports entre morphogénèse et métabolisme, est soulevée, avec les thalles immergés, par la constatation de phénomènes similaires obtenus par une meilleure aération et, autrement, par la restriction en azote du milieu; il y a là une action convergente dont nous chercherons à éclairer la nature. Notre méthode d'étude consiste à examiner l'influence de la restriction en azote chez des champignons de plus en plus exigeants et sensibles au point de vue des conditions d'aération et à les soumettre, dans chaque cas, à des différences d'aération, puisque, morphologiquement, dans de nombreux cas, la restriction en azote paraît sensibiliser le champignon à l'action de l'oxygène.

Le premier organisme étudié est *GEOTRICHUM CANDIDUM* ensemencé en Erlenmeyer de 300 cm³ dans 50 cm³ de milieu renfermant initialement 1.200 mg de glucose et 37 mg 33 d'azote sous forme de sulfate d'ammonium. Durée de culture : 4 jours .
(voir tableau 4)

TABLEAU 18 (GEOTRICHUM CANDIDUM)

Azote du milieu		SANS AGITATION			AVEC AGITATION		
Concen- tration	Quantité absolue	Ps	Gc/Ps	Nt%Ps	Ps	Gc/Ps	Nt%Ps
N/18,75	: 37 mg 33	II2,9	: 3,7	: 6,5	II3,0	: 3,8	: 6,7
"	: "	II4,2	: 3,4	: 6,3	:	:	:
N/37,5	: 18 mg 66	II2,5	: 3,3	: 6,3	II4,9	: 3,1	: 6,8
"	: "	IO2,0	: 4,1	: 6,3	:	:	:
N/75	: 9 mg 33	87,2	: 3,8	: 7,0	90,9	: 3,3	: 7,0
"	: "	87,8	: 4,0	: 6,8	:	:	:
N/150	: 4 mg 66	74,8	: 2,9	: 6,2	78,7	: 2,6	: 6,4
"	: "	71,1	: 2,3	: 5,5	:	:	:

Les poids secs décroissant dans un ordre de valeurs relatives I - I - 0,77 - 0,66 avec agitation et I - I - 0,8 - 0,69 sans agitation et cet ordre est tout à fait indépendant de la quantité initiale d'azote du milieu. L'aération ne modifie pas les récoltes.

Les rapports glucose consommé/poids sec ne sont guère modifiés qu'à la concentration en azote la plus faible et sont abaissés, alors.

Les teneurs en azote sont partout du même ordre de grandeur. Ces résultats sont une moyenne obtenue avec de très nombreux échantillons; dans quelques cas il y a eu addition d'eau de levures, ce qui explique que, l'azote du milieu étant épuisé, on trouve dans un cas un peu plus d'azote dans le champignon qu'on n'en avait introduit dans le milieu sous forme de sulfate d'ammonium.

Cette expérience montre

- d'une part que GEOTRICHUM CANDIDUM est peu sensible à l'action d'une restriction en azote comme il est peu sensible à des variations d'aération.

- d'autre part que la restriction en azote ne modifie pas sa sensibilité à l'oxygène.

Nous remarquons d'ailleurs que son aspect de développement est uniforme sur milieux non agités et ~~na~~ peut mieux être comparé qu'à un " état immergé en surface " Rappelons que cet organisme présente une tendance spontanée à l'extension en profondeur et que la restriction en azote ne fait qu'accentuer cette tendance.

CANDIDA HUMICOLA est cultivé dans des conditions un peu différentes et qui sont indiquées pour le tableau 5; en effet, la concentration initiale en glucose est double, il y a addition d'un peu d'eau de levures et la durée est de 7 jours. (voir tableau 5).

TABLEAU 19 (CANDIDA HUMICOLA)

Azote du ::		SANS AGITATION			::		AVEC AGITATION		
milieu	::	Ps	: Gc/Ps	: Nt%Ps	::	Ps	: Gc/Ps	: Nt%Ps	:
37 mg 33	::	297	: 4,6	: 4,7	::	302	: 4,0	: 4,8	:
18 mg 66	::	231	: 4,8	: 4,9	::	-	: -	: -	:
9 mg 33	::	203	: 4,5	: 3,9	::	183	: 4,9	: 5,2	:
4 mg 66	::	113	: 4,6	: 3,6	::	112	: 4,7	: 4,6	:

Les récoltes diminuent dans un ordre de valeurs relatives I - ? - 0,60 - 0,37 avec agitation et I - 0,77 - 0,68 - 0,38 sans agitation et cet ordre est tout à fait indépendant de la quantité d'azote initiale du milieu. L'aération ne modifie guère les récoltes.

Les rapports glucose consommé/poids sec oscillent, avec quelques irrégularités, autour d'une valeur moyenne de 4,5.

Les teneurs en azote, stables sur milieux agités, diminuent avec la concentration en azote sur ceux qui ne le sont pas. A vrai dire si on rapporte le glucose consommé non plus au poids sec, mais à l'azote total, ce champignon se révèle déjà plus sensible à la restriction en azote du milieu que *GEOTRICHUM CANDIDUM*.

Sur les échantillons non agités, le voile tend déjà à s'immerger sous l'influence de la restriction en azote et l'élongation cellulaire est plus prononcée. Chez le champignon à filamentisation précoce et importante avec tendance spontanée au développement en profondeur de milieux de culture solides, la restriction en azote ne fait qu'accentuer ces caractères morphologiques spontanés.

PICHIA ASCOFILAMENTOSA a été écarté jusqu'ici parce que cette levure azymatique produisant un voile précoce et membraneux comme tous les *PICHIA*, n'utilisait ni le sulfate d'ammonium, ni le nitrate de sodium. Nous employons ici l'acide glutamique, les effets d'une restriction en azote dépendant beaucoup moins de la nature de la source azotée que de sa faible concentration, comme nous avons pu le vérifier par des essais, non rapportés ici, sur peptones avec divers organismes. Le champignon est ensemencé soit en boîtes de ROUX de 1 L, soit en Erlenmeyer de 300 cm³, dans 100 cm³ de milieu renfermant 4.800 mg de glucose et 74 mg 66 ou 18 mg 66 (N/18,75 et N/75) d'azote sous forme d'acide glutamique. Durée : 4 jours.

TABLEAU 20 (*PICHIA ASCOFILAMENTOSA*)

Azote initial :	S/V :	Ps :	Gc/Ps :	Nt%Ps :	Lt%Ps :	Pl%Ps :
74 mg 66 :	0,57 :	I.33I :	2,4 :	4,4 :	I2,5 :	0,089 :
I8 mg 66 :	0,57 :	372 :	2,8 :	3,4 :	I5,9 :	0,098 :
74 mg 66 :	2,2 :	I.790 :	2,8 :	4,I :	I3,2 :	0,079 :
I8 mg 66 :	2,2 :	572 :	3,4 :	3,5 :	I7,8 :	0,078 :

En Erlenmeyer, la récolte est réduite dans les mêmes proportions que la concentration initiale en azote du milieu. Le rapport glucose consommé/poids sec s'élève un peu sous l'influence de la restriction en azote du milieu, mais le fait que l'acide glutamique est, en même temps, un aliment ternaire gêne l'interprétation de la modification de ce rapport. Plus significatifs sont la baisse de 23 p. 100 de la teneur en azote et l'augmentation de 27 p. 100 de la teneur en lipides totaux sous l'influence de la restriction en azote du milieu.

En boîtes de ROUX, la récolte est de 25 p. 100 plus forte qu'en Erlenmeyer à la concentration en azote N/18,75 et de 35 p. 100 à la concentration N/75. Avec la restriction en azote elle est 3,15 fois moindre au lieu de 3,6 fois en Erlenmeyer. On ne peut ici aussi attribuer grande valeur à l'élévation du rapport glucose consommé/poids sec. La restriction en azote fait également diminuer la teneur en azote de 15 p. 100 et augmenter celle en lipides totaux de 33 p. 100 à partir d'une teneur légèrement supérieure à celle trouvée en Erlenmeyer. Le phosphore lipidique en % Ps est moins élevé qu'en boîtes de ROUX. Notons que nous avons trouvé une teneur élevée en acides gras des lipides totaux (76 et 67 p. 100) et une teneur élevée en réducteur total (44 p. 100).

La comparaison des expériences en Erlenmeyer et en boîtes de ROUX nous révèle que dans le cas des Erlenmeyer, il reste encore disponible un tiers de la source azotée et son épuisement ne peut être responsable de la différence des récoltes au contraire des cultures en boîtes de ROUX où le milieu est près d'être épuisé en azote; par suite il apparaît que la faible concentration en azote du milieu joue un rôle aussi important que son épuisement rapide. Une seconde constatation, importante à nos yeux, c'est que la restriction en azote favorise beaucoup plus fortement la lipogénèse que ne pourrait le faire une meilleure aération; il y a à retenir que l'aération et la restriction en azote ont cependant à cet égard " une action convergente "; enfin, nous retrouvons ici le balancement entre les valeurs de l'azote total et celles des lipides totaux constaté par HEIDE, puis RAAF.

PICHLA ASCOFILAMENTOSA est un organisme plus aérobie que les précédents, car sa croissance augmente nettement avec l'aération, cependant nous avons trouvé qu'une aération violente, dans des expériences non rapportées ici, diminue les récoltes. Aussi considérons nous cet organisme comme tenant une place intermédiaire entre les précédents et les suivants. Dans la présente expérience, nous constatons la production d'un voile épais et membraneux qui commence à s'immerger dès que le milieu s'épuise fortement en azote; lorsqu'il y a restriction en azote du

milieu, cette tendance s'accroît et nous constatons en même temps que le voile est beaucoup plus fortement pigmenté en brun orange avec de nombreuses cellules élonguées et des asques en abondance.

Nous avons aussi examiné l'influence de la restriction en azote chez *HANSENULA ELLIPSOIDOSPORA*, mais sans faire varier l'aération. Le champignon est ensemencé en Erlenmeyer de 300 cm³ dans 100 cm³ de milieu renfermant 4.000 mg de glucose (M/3,75). La source azotée est le nitrate de sodium. La durée de culture est de 4 et 7 jours.

TABLEAU 2I (*HANSENULA ELLIPSOIDOSPORA*)

Azote		QUATRE JOURS					SEPT JOURS				
initial	Ps	Gc/Ps	Gc/Nt	Nt/Ps	pHs	CPs	Gc/Ps	Gc/Nt	Nt/Ps	pHs	CPs
74 mg	66:: 420	7,7	118	6,5	3,9	919	5,4				
37 mg	33:: 254	9,6	155	6,2	3,8	395	11,5	223	5,1		
18 mg	66:: 240	9,5	152	6,2	3,7	319	11,4	223	5,4		
9 mg	33:: 204	9,7	205	4,7	3,9	193	21,5	435	4,9		
4 mg	66:: 130	9,4	248	3,8	3,7	143	15,7	425	3,7		

On voit qu'à la concentration en azote la plus élevée, la récolte est considérable, nettement plus importante que dans des expériences similaires, mais où la concentration en glucose est plus forte (M/2,4 au lieu de M/3,75); par exemple dans une de ces expériences dont nous ne rapportons pas les détails, nous trouvons Ps 306 mg, Gc/Ps 8,6, Nt/Ps 6,5 pour la même durée; en effet, avec cette levure en Erlenmeyer où l'aération est médiocre, une augmentation de la concentration en glucose freine la croissance et élève le taux de consommation de glucose.

Dans ce qui suit, nous comparerons ce qui se passe aux quatre concentrations inférieures en azote : N/37,5 - N/75 - N/150 - N/300.

Au bout de quatre jours, aux deux concentrations inférieures, l'azote du milieu est épuisé avec forte diminution de la teneur en azote du champignon, avec plus fort rapport glucose consommé/azote total alors que le rapport glucose consommé/poids sec a la même valeur aux quatre concentrations.

Au bout de sept jours, les récoltes ont un peu augmenté aux concentrations N/37,5 et N/75 avec élévation du rapport glucose consommé/poids sec et du rapport glucose consommé/azote total qui est modérée; il y a en même temps diminution de la teneur en azote.

Au bout de sept jours, aux deux concentrations inférieures, la récolte est à peu près la même qu'au bout de quatre jours et les teneurs en azote très basses ne sont guère modifiées, mais l'organisme, demeuré vivant bien que freiné dans sa

croissance continue d'utiliser le glucose si bien que les rapports de consommation deviennent très élevés. Le voile est immergé et l'élongation cellulaire importante dès le quatrième jour.

Nous venons d'examiner des champignons de plus en plus exigeants en oxygène; le dernier exemple que nous citerons est celui de *PULLULARIA PULLULANS* dont la croissance est vite freinée par l'insuffisance d'aération et dont la différenciation morphologique augmente avec elle. Nous le cultivons dans les conditions déjà indiquées au tableau 2 (50 cm³ de milieu dans des Erlenmeyer de 300 cm³ agités ou non; le milieu renferme 1.200 mg de glucose et enfin le 1^{er} azote sous forme de sulfate d'ammonium; durée de culture : 7 jours)

TABLEAU 22 (*PULLULARIA PULLULANS*)

Azote : SANS AGITATION				:: AVEC AGITATION			
Initial	Ps	Gc/Ps	Nt%Ps	Ps	Gc/Ps	Nt%Ps	
37 mg 33	II4,4	7,9	5,9	260,7	4,6	4,9	
18 mg 66	II4,8	7,8	5,6	223,2	5,4	5,0	
9 mg 33	II9,9	7,7	5,6	177,5	6,4	4,3	
4 mg 66	IO8,5	7,5	4,3	II7,9	6,7	3,7	

Ce tableau fait ressortir les faits suivants :

- L'aération accroît l'utilisation de l'azote et la croissance qui se fait avec une consommation moindre de glucose.
- L'aération fait ressortir les effets de la restriction en azote avec élévation du taux de consommation de glucose plus vite que la diminution de la teneur en azote total.
- Alors qu'en milieu aéré, les récoltes diminuent dans un ordre relatif 1 - 0,86 - 0,69 - 0,45, en milieu peu aéré elles sont similaires avec un même taux de consommation de glucose et la teneur en azote n'est abaissée qu'à la concentration la plus basse en azote.
- La restriction en azote, lorsque l'aération est suffisante, provoque un fort allongement mycélien avec accentuation de la progression centrifuge du cytoplasme, ce qui montre, une nouvelle fois, que l'extension prise par le champignon n'a pas de rapport avec sa croissance vraie dans ces conditions. On trouve une masse importante de membranes. Aux deux concentrations inférieures en milieu aéré et à la concentration inférieure en azote en milieu peu aéré, il y a une forte pigmentation et diffusion de ce pigment noirâtre dans le milieu; il y a enfin beaucoup de chlamydospores.

La comparaison de tous ces champignons : *GEOTRICHUM CANDIDUM*, *CANDIDA HUMICOLA*,

PICHLA ASCOFILAMENTOSA, HANSENULA ELLIPSOÏDOSPORA, PULLULARIA PULLULANS, dans ces expériences où nous combinons les variations de la concentration initiale en azote avec l'aération plus ou moins forte, révèle que :

- leur type métabolique est aussi distinct que l'est leur type d'évolution morphologique.

- les organismes différenciés d'emblée (GEOTRICHUM CANDIDUM) ou très précocément et facilement (CANDIDA HUMICOLA) qui présentent une tendance spontanée au développement immergé dans les milieux de culture solides, sont aussi peu sensibles à une restriction en azote du milieu qu'à des différences d'aération.

- les organismes, dont la différenciation morphologique augmente avec l'aération (PICHLA ASCOFILAMENTOSA, HANSENULA ELLIPSOÏDOSPORA, PULLULARIA PULLULANS) sont aussi sensibles à la restriction en azote qu'à une différence d'aération. La restriction en azote les sensibilise à l'action de l'oxygène et les influence comme une meilleure aération en provoquant des modifications morphologiques correspondantes en relation avec une accentuation de la progression centrifuge du cytoplasme et d'autres telles que l'édification de membranes et la production de pigments.

Ainsi, on trouve, dans ces expériences, une relation manifeste entre des modifications apportées à la morphogénèse et des changements concomitants de la croissance, du comportement physiologique (développement par rapport aux surfaces), du comportement métabolique (utilisation du glucose et de l'azote), de composition chimique de l'organisme (teneur en azote sans négliger le fait que la restriction en azote favorise la lipogénèse, etc...).

La restriction en azote que nous avons réalisée dans les expériences rapportées ci-dessus entraîne une modification du rapport N/C initial du milieu de culture. Nous avons voulu voir ce qui se passe lorsqu'on diminue en même temps les concentrations en azote et en glucose du milieu, en ayant au départ un rapport N/C fixe. Nous avons choisi GEOTRICHUM CANDIDUM parce que, chez lui, si modifications métaboliques il y a, elles ne sont pas dûes à un changement de forme. Les conditions de milieu et de culture sont celles du tableau 3 (dans Erlonmeyer de 300 cm³, 50 cm³ de milieu renfermant 1.200 mg de glucose et 37 mg 33 d'azote sous forme de sulfate d'ammonium, milieu que l'on dilue globalement 2 - 4 et 8 fois; durée de culture : 7 jours).

TABLEAU 23 (GEOTRICHUM CANDIDUM)

Dilution	Azote	SANS AGITATION				AVEC AGITATION				
		initial	Ps	Gc/Ps	Nt%Ps	Ps	Gc/Ps	Nt%Ps	Pt%Ps	
0	37 mg 33:	I64	4,5	6,2	172	4,5	6,5	I,0		
2	I8 mg 66:	I03	4,3	7,0	124	3,5	-	I,0		
4	9 mg 33:	48	4,4	7,5	45	4,0	8,0	I,4		
8	4 mg 66:	22	3,8	8,8	I9	2,8	9,0	I,4		

Les croissances suivent l'ordre des dilutions et cet ordre est le même que les milieux soient agités ou non : respectivement I - 0,72 - 0,26 - 0,11 et I - 0,69 - 0,29 - 0,125. On constate une fois de plus que les conditions d'aération en Erlenmeyer non agités sont déjà optima.

Les rapports glucose consommé/poids sec ne sont nettement diminués qu'à la plus forte dilution et il est paradoxal de constater que la croissance est la plus économique là où elle est insignifiante; nous avons déjà constaté dans les expériences sur la restriction en azote, qu'à la concentration la plus faible en cette substance le rendement matériel était le meilleur.

Les teneurs en azote augmentent nettement et de façon importante avec la dilution; elles sont très élevées (8,8 et 9) à la dilution la plus forte; c'est le contraire de ce qui est observé lors de la restriction en azote (tableau I8).

Les teneurs en phosphore total augmentent moins rapidement que les teneurs en azote total, mais la constatation est aussi étrange d'une teneur très élevée en phosphore total aux plus fortes dilutions.

On voit que, dans ces expériences de dilution, la croissance et la composition chimique de l'organisme sont beaucoup plus vite et fortement affectés que dans les expériences avec restriction en azote où l'on a partout au départ la même concentration en glucose. C'est là une indication sur l'influence du rapport N/C sur le métabolisme et la composition chimique dont l'étude, tant sur le plan morphologique que sur le plan physiologique, ne peut être entreprise valablement qu'après avoir établi, comme nous avons essayé de le faire, l'influence propre des hautes comme des basses concentrations en azote du milieu.



QUATRIEME PARTIE

ACTION DE TRACES DE SUBSTANCES DIVERSES SUR LE METABOLISME ET MODIFICATIONS MORPHOLOGIQUES CONSECUTIVES.

A . INTRODUCTION .

Dans cette nouvelle partie de notre exposé, au lieu de rechercher les changements métaboliques se rapportant à des modifications de forme, nous ajoutons au milieu de culture des traces de substances ayant une action biochimique connue, nous examinons leur action sur le métabolisme et nous observons s'il y a des modifications consécutives de forme par comparaison avec ce que nous trouvons sur des milieux témoins sans addition de ces substances; en somme, nous procédons de façon inverse des expériences précédentes et nous vérifions, par voie réciproque, leurs résultats, ce qui permettra d'en valider et d'en élargir l'interprétation.

En effet, nous avons trouvé une "action convergente" des facteurs suivants: aération, acides organiques du métabolisme intermédiaire, azote nitrique, restriction en azote du milieu sur la morphogénèse; ils accentuent la "progression centrifuge du cytoplasme"; nous avons reconnu que l'azote nitrique et la restriction en azote stimulent la consommation aérobie du glucose; ainsi s'expliquerait leur "action convergente" sur la morphogénèse. En même temps nous avons été amenés à nous demander si, dans les milieux de culture, l'oxygène n'agirait pas indirectement sur le métabolisme glucidique par l'intermédiaire du facteur azoté ou, pour s'exprimer autrement encore, si ce n'est pas le facteur azoté qui détermine l'intensité et l'orientation du métabolisme glucidique. Le plus difficile évidemment était de trouver les moyens expérimentaux capables d'étayer cette hypothèse dont l'intérêt et l'importance ne sauraient échapper puisqu'elle tend à faire rejeter, au moins sur le plan physiologique, la conception du métabolisme du glucose comme entité ou système autonome. Rappelons cette conception classique, strictement logique dans son apparence : le métabolisme du glucose est le "primum movens"; libérant de l'énergie, il assure l'utilisation de la source azotée et notamment la réduction de l'azote nitrique, il permet les synthèses; malheureusement cette conception néglige un élément fondamental : les conditions physiologiques initiale et ultérieures où doivent s'opérer ces transformations ou, si on préfère une expression plus imagée, la réserve d'énergie potentielle que l'organisme trouve dans le milieu extérieur, non seulement sous sa forme de l'aliment ternaire, mais de

tous les facteurs qui détermineront la vitesse, l'intensité et l'orientation de leur utilisation, dont nous trouvons l'action si importante dès le début sur la morphogénèse et puis il y a le fait si intéressant, dont nous avons déjà donné un exemple (traces d'ammoniaque en présence d'azote nitrique, tableau I5), que tout produit d'un métabolisme pourrait agir, par récurrence, sur le métabolisme du produit d'origine.

Nous avons choisi les substances " oligodynamiques " suivantes : cystéine, ancurine, fluorure de sodium, acide malonique, divers acides organiques du métabolisme intermédiaire, parce qu'elles nous paraissaient convenir le mieux pour établir la nature de l'influence de la source azotée sur le métabolisme glucidique et sur la morphogénèse.

Comme nos observations nous ont conduit à penser que l'action convergente de l'aération, de l'azote nitrique, de la restriction en azote pourrait s'expliquer par une action intermédiaire commune sur la " respiration cellulaire ", nous nous sommes placés dans les conditions expérimentales où le champignon était particulièrement sensible à l'action de l'oxygène et exigeant au point de vue aération; pour atteindre ce but, nous avons employé comme source d'azote le nitrate de sodium. Nous verrons que l'emploi de l'azote nitrique fait ressortir au maximum l'action de substances oligodynamiques sur le métabolisme; nous avons ouvert ainsi une voie originale et, semble-t-il, intéressante d'exploration fonctionnelle de ces organismes.

Enfin, nous avons utilisé les champignons que nous avons trouvés être les plus sensibles et les plus exigeants au point de vue aération : *PULLULARIA PULLULANS* et *HAUSENULA ELLIPSOIDOSPORA*.

Nous ne donnons ici que quelques exemples dans cette voie d'exploration physiologique fonctionnelle qui offre tant de possibilités à des investigations rationnelles.

B . ACTION DE LA CYSTEINE CHEZ *PULLULARIA PULLULANS* .

Diverses raisons nous ont incité à essayer l'action de la cystéine en présence de nitrate de sodium chez ce champignon :

- le fait qu'elle est rarement utilisable comme source d'azote unique par les champignons et les microorganismes alors qu'on la trouve comme constituant de protéines et notamment d'un polypeptide qui est un constituant cellulaire à peu près universel : le glutathion réduit.

- l'intervention reconnue du groupe sulfhydryle dans diverses actions enzymatiques (HOPKINS et MORGAN, WURMSER et RAPKINE); on connaît des enzymes à groupe -SH tels que la succino-déshydrase de THUNBERG (QUASTEL et WOOLDRIDGE), le rôle éventuel du glutathion comme coferment, l'inhibition de la cytochrome-oxydase par la cystéine, etc..., ce qui laisse penser que la cystéine, ajoutée à un milieu de culture, a une action complexe et qui n'est pas spécifique. Les recherches de HOOGERHEIDE, de KLUYVER et CUSTERS sur des levures vivantes montrent d'après les données obtenues avec l'appareil de WARBURG que si la cystéine diminue la consommation d'oxygène, elle favorise les fermentations aérobie et anaérobie.

- la constatation que la cystéine ne convient pas comme source d'azote pour PULLULARIA PULLULANS, tout en n'étant pas toxique pour lui; la récolte est alors insignifiante, mais avec un rapport glucose consommé/poids sec = 2,5, le plus bas que nous ayons trouvé avec cet organisme; ceci explique que nous ayons voulu examiner l'action de traces de cystéine en présence de nitrate de sodium qui détermine, nous l'avons vu, le rapport glucose consommé/poids sec le plus élevé.

PULLULARIA PULLULANS est ensemencé soit sous sa forme chlamydospores (C), soit sous sa forme DEMATIUM habituelle (D) ou après entraînement sur nitrate (N); en boîtes de ROUX de 1 L, dans 100 cm³ de milieu contenant 74 mg 66 d'azote sous forme de nitrate de sodium et 4.800 mg de glucose. La cystéine est stérilisée à part et ajoutée au milieu où sa concentration est M/300. Durée de culture 7 jours.

TABLEAU 24

Forme en-	Cystéine	Ps	Gc/Ps	Nt%Ps	Différences	Différences
semencée	M/300	::	:	:	en Ps	en Nt
:	::	:	:	:	abs : en %	abs : en %
D	0	:: 651	7,2	4,3	::	
D	+	:: 488	5,3	4,2	:: -163 : 25	: -7,7 : 27
N	0	:: 414	6,9	4,2	::	
N	+	:: 319	5,0	4,8	:: -95 : 23	: -2,1 : 12
C	0	:: 151	10,5	5,5	::	
C	+	:: 264	6,5	5,3	:: +113 : 75	: +5,8 : 70

Avec les formes (D) et (N) dont nous avons vu qu'elles étaient similaires, la cystéine diminue la croissance pondérale de 25 %. Elle l'augmente de 75% à partir de la forme chlamydosporee.

L'adjonction de cystéine diminue légèrement la croissance en surface, inhibe la production de pigment avec (D) et (N). Chez (C) au contraire, elle favorise le développement en surface, la pigmentation, la formation de mycélium amenant en fait une évolution vers la forme DEMATIUM.

La cystéine, dans tous les cas, abaisse le rapport glucose consommé/poids sec

et l'amène à une valeur normalement trouvée en présence d'une source ammoniacale ou aminée.

Par contre, elle ne modifie guère les teneurs en azote plus élevées, nous le voyons, avec la forme chlamydosporée.

Diverses autres expériences nous ont permis de faire les observations complémentaires suivantes :

- l'action de la cystéine est encore sensible à la concentration M/I.200.
- ses effets persistent quand on diminue l'aération, même fortement.
- si nous remplaçons le nitrate de sodium par le sulfate d'ammonium, nous trouvons, avec la forme chlamydosporée, que l'adjonction de cystéine freine la croissance et élève le rapport glucose consommé/poids sec.
- si nous remplaçons la cystéine par la méthionine en présence de nitrate de sodium avec cette forme chlamydosporée, il y a une même augmentation des récoltes et un même abaissement du taux de consommation de glucose; mais la méthionine est une bonne source d'azote et ceci gêne l'interprétation. L'adjonction de glycocolle par contre ne modifie guère les récoltes et le taux de consommation de glucose; tout au plus accroît-elle légèrement la teneur en azote des récoltes.

L'ensemble de ces résultats nous permet par cette action de la cystéine :

- 1° d'opposer davantage les deux formes DEMATIUM et chlamydosporée au point de vue de leur croissance et de leur évolution morphologique.

- 2° de révéler pour la cystéine une action stimulatrice de la croissance dans certaines conditions alors qu'on ne connaît, chez les champignons, que son effet inhibiteur.

- 3° d'opposer plus fortement encore l'action de l'azote ammoniacal et de l'azote nitrique sur la croissance et le métabolisme glucidique.

- 4° de confirmer l'importance des processus d'adaptation à l'aérobiose plus forte dans l'assimilation de l'azote nitrique puisque, avec la forme chlamydosporée, profonde, la cystéine favorise cette adaptation probablement (mais ceci est difficile à déterminer quantitativement) en modifiant le niveau d'ensemble des oxydo-réductions cellulaires. Morphologiquement, nous observons au départ une plus grande proportion de chlamydospores germant.

- 5° de prouver, chez ce champignon à rapport glucose consommé/poids sec normalement élevé, que l'augmentation de celui-ci en présence de nitrate de sodium n'est pas imposé (comme c'est le cas pour ASPERGILLUS NIGER, semble-t-il) par la nécessité de la réduction de l'azote nitrique en azote aminé puisque la cystéine abaisse,

en sa présence et quelle que soit la forme morphologique de départ, le taux de consommation de glucose en l'amenant à une valeur trouvée avec une source azotée ammoniacale ou aminée alors que, au contraire, la cystéine élève le taux de consommation de glucose en présence d'une source ammoniacale. Ceci permet de conclure que l'azote nitrique stimule la consommation de glucose par une action propre et spécifique dont nous discuterons la nature dans la dernière partie de l'exposé.

6° de présumer que cette action de la cystéine s'exerce sur le métabolisme intermédiaire en influençant probablement les équilibres d'oxydo-réduction (en affectant leur niveau ou potentiel), qu'elle s'exerce plus précisément sur la "respiration cellulaire" telle que la conçoivent les théories actuelles depuis les découvertes fondamentales de H. WIELAND, car nous voyons la cystéine provoquer un abaissement du rapport glucose consommé/poids sec en présence de nitrate de sodium, même lorsque l'aération est faible pour *PULLULARIA PULLULANS*.

C. ACTION DE L'ANFURINE CHEZ HANSENULA ELLIPSOIDOSPORA.

L'aneurine favorisent la fermentation alcoolique en tant que coferment (LOHMANN et SCHUSTER) de la décarboxylase de l'acide pyruvique (NEUBERG), il nous a paru intéressant d'éprouver son action en présence de nitrate de sodium chez *HANSENULA ELLIPSOIDOSPORA*; nous avons en effet trouvé que le nitrate de sodium ne convient pas comme source azotée dans les tubes de fermentation et que, avec la forme habituelle (h) ou normale de cet *HANSENULA*, la production d'alcool en % du poids sec, dans les cultures en aérobiose, était considérablement moindre en présence de nitrate de sodium que de nitrate d'ammonium (tableau I6). Nous reproduisons les mêmes conditions de milieu et de culture; nous ensemençons la forme (h) en boîtes de ROUX de 1 L dans 100 cm³ de milieu renfermant comme précédemment 7.500 mg de glucose et 74 mg 66 d'azote soit sous forme de nitrate de sodium, soit sous forme de nitrate d'ammonium. Durée de culture : 4 jours. L'aneurine est ajoutée à raison de 300 μ g par 100 cm³ de milieu :

TABLEAU 25 (*HANSENULA ELLIPSOIDOSPORA*)

Source d'N:	B _T :	Ps	Gc/Ps	Nt%Ps	Rt%Ps	Lt%Ps	Pl%Ps	Alc%Ps	pH
NO ₃ Na	: 0	::605	: 7,7	: 6,4	: 32,2	: 10,33	: 0,154	: 56,5	: 4,0
"	: +	::320	: 16,4	: 8,1	: 25,5	: 8,2	: 0,123	: 244	: 4,4
NO ₃ NH ₄	: 0	::884	: 6,9	: 7,7	: 34,6	: 6,1	: 0,108	: 96	: 3,2
"	: +	::775	: 9,6	: 8,8	: 32,5	: 6,1	: 0,100	: 144	: 2,9

L'aneurine diminue beaucoup plus fortement la récolte (1,9 fois) en présence

de nitrate de sodium que de nitrate d'ammonium 1,14 fois.

Les rapports glucose consommé/poids sec sont respectivement 2,1 et 1,4 fois plus élevés et s'accompagnent

- dans le cas du nitrate de sodium

- d'une production d'alcool en % du Ps 4,5 fois plus forte

- d'une diminution des teneurs en réducteur total 1,27 fois moindre, en lipides totaux et phosphore lipidique 1,26 fois moindre.

- dans le cas du nitrate d'ammonium

- d'une production d'alcool en % du Ps 1,5 fois plus forte

- d'une légère diminution de la teneur en réducteur total seulement

Les teneurs en azote total sont fortement accrues, respectivement 1,26 et 1,14.

On constate un étroit parallélisme des phénomènes morphologiques avec les données biochimiques sur nitrate de sodium :

- le voile est tardif, mince et muqueux, non persistant.

- il y a réduction morphologique comme sous l'effet d'une faible aération: état blastosporé pur sans élongation cellulaire, ni production d'asques.

Diverses autres expériences nous ont permis de faire les observations complémentaires suivantes :

- l'augmentation de l'aération restreint à peine l'effet inhibiteur de l'aneurine sur la croissance en présence de nitrate de sodium.

- en Erlenmeyer, au bout de 7 jours, la récolte est très inférieure par rapport aux témoins quand on emploie le nitrate de sodium comme source d'azote.

- l'addition en plus de fluorure de sodium donne une action intriquée de ces deux substances; celle d'acide malonique laisse prédominer l'action de l'aneurine.

L'ensemble de ces résultats nous permet :

1° de constater, sur le plan métabolique, l'antagonisme de l'influence de l'aneurine et de l'azote nitrique.

2° de montrer que l'aneurine agit, en présence de nitrate de sodium, comme une diminution d'aération.

3° de confirmer que l'azote nitrique stimule la consommation aérobie du glucose et la progression centrifuge du cytoplasme.

4° d'établir la valeur du voile comme manifestation morphologique équivalente de la progression centrifuge du cytoplasme.

5° d'opposer davantage nitrate de sodium et nitrate d'ammonium dans leurs effets sur la croissance, le métabolisme glucidique et la morphogénèse.

D. ACTION DU FLUORURE DE SODIUM CHEZ *HANSTNULLA ELLIPSOIDOSPORA*.

Le fluorure de sodium, substance toxique, est connu en enzymologie comme inhibiteur de divers systèmes enzymatiques touchant au métabolisme du glucose. EFFRONT (1894) a, le premier, essayé son action sur la levure vivante et montré que celle-ci s'accoutumait à des concentrations croissantes en fluorure.

Les conditions de milieu et de culture sont les mêmes que précédemment (tableau 25); le fluorure se trouve être à une concentration M/600 :

TABLEAU XXVI (*HANSTNULLA ELLIPSOIDOSPORA*)

Source d'N:	NaF :	Ps :	Gc/Ps :	Nt%Ps :	Rt%Ps :	Lt%Ps :	Pl%Ps :	Alc%Ps :	pH :
NO ₃ Na	: 0 :	605 :	7,7 :	6,4 :	32,2 :	10,3 :	0,154 :	56,5 :	4,0 :
"	: + :	492 :	5,7 :	7,6 :	28,8 :	10,6 :	0,172 :	63 :	5,2 :
NO ₃ NH ₄	: 0 :	584 :	6,9 :	7,7 :	34,6 :	6,1 :	0,108 :	96 :	3,2 :
"	: + :	58 :	6,4 :	7,8 :	- :	- :	- :	- :	- :

Sous l'influence du fluorure de sodium la récolte est 1,23 fois moindre sur nitrate de sodium et plus de 15 fois moindre sur nitrate d'ammonium.

En présence de nitrate de sodium, le rapport glucose consommé/poids sec est 1,35 fois moindre avec une production d'alcool 1,1 fois plus forte, une teneur en réducteur total 1,1 fois plus faible, en phosphore lipidique 1,1 fois plus forte alors que celle en lipides totaux n'est pas modifiée. La teneur en azote total est 1,2 fois plus élevée.

Le phénomène morphologique marquant est l'inhibition apparemment totale de la croissance durant les 48 premières heures, puis la formation très rapide du voile.

La forme voile (v) est cultivée identiquement sur nitrate de sodium :

TABLEAU XXVII (*HANSTNULLA ELLIPSOIDOSPORA*, forme v)

Source d'N:	NaF :	Ps :	Gc/Ps :	Nt%Ps :	Rt%Ps :	Lt%Ps :	Pl%Ps :	Alc%Ps :	:
NO ₃ Na	: 0 :	724 :	5,7 :	7,0 :	39,6 :	9,7 :	0,134 :	39 :	:
"	: + :	450 :	4,6 :	7,3 :	32,6 :	11,3 :	0,176 :	30 :	:

Cette forme (v) est plus sensible encore à l'action du fluorure de sodium qui diminue plus fortement sa croissance. Le rapport glucose consommé/poids sec est moins fortement abaissé; la production d'alcool en % du Ps est diminuée; la teneur en réducteur total est plus fortement diminuée tandis que celle en lipides totaux et en phosphore lipidique est augmentée. La teneur en azote total n'est pas modifiée et ceci traduit encore une réaction différente des formes (h) et (v).

Diverses autres expériences nous ont permis de faire les observations complémentaires suivantes :

- l'effet toxique est proportionnel à la concentration en fluorure et son

action se fait nettement sentir dès une concentration M/I.200

- l'effet toxique en présence de nitrate de sodium est d'autant moins prononcé que les cultures sont plus aérées et que la concentration en glucose est moins forte.

- une fois la phase d'inhibition passée, le voile se développe rapidement et intensément; la récolte rattrape très vite celle des témoins; il y a en même temps une forte élongation cellulaire et production d'asques, caractères qui manquent dans les expériences des tableaux 26 et 27, vu leur faible durée relative.

- le pH est constamment élevé et EFFRONT avait déjà constaté que le fluorure diminue la production d'acides organiques.

- l'addition d'acide malonique au fluorure de sodium en présence de nitrate de sodium provoque une inhibition totale et définitive.

L'ensemble de ces résultats montre que :

1° le fluorure de sodium est relativement peu toxique en présence de nitrate de sodium alors qu'il l'est fortement en présence de nitrate d'ammonium, ce qui, comme pour l'ancurine, mais de façon inverse, nous permet d'opposer ces deux sources azotées dans leurs effets sur la croissance, le métabolisme glucidique et la morphogénèse.

2° le fluorure de sodium abaisse le taux de consommation de glucose et procure, une fois la phase d'inhibition levée, une croissance plus économique.

3° après une période initiale d'inhibition, le voile se développe rapidement en présence de nitrate de sodium.

4° son action sur l'organisme vivant est plus complexe que ne le font penser les données enzymologiques.

E . ACTION DE L'ACIDE MALONIQUE CHEZ HANSENULA ELLIPSOIDOSPORA.

Comme l'acide malonique est un inhibiteur de la succino-déshydrase, enzyme dont on sait le rôle fondamental dans la respiration cellulaire, comme d'autre part la réduction biologique de l'azote nitrique est favorisée par l'aération chez les champignons, nous avons examiné l'action de l'acide malonique chez HANSENULA ELLIPSOIDOSPORA sur notre milieu nitrate de sodium-glucose habituel.

Nous ensemençons une anse d'une culture récente sur milieu de GORODKOVA gélosé en Erlenmeyer de 300 cm³ dans 100 cm³ de milieu renfermant 7.500 mg de glucose (M/2,4) et 74 mg 66 d'azote (N/I8,75) sous forme d'azote nitrique. L'acide malonique est ajouté aux concentrations M/4.800 (2mgI7), etc....Durée de culture : 3 jour

TABLEAU 28 (HANSENULA ELLIPSOIDOSPORA)

Acide malonique :	Ps :	Gc/Ps :	Nt/Ps :	Gains en Ps :: abs :	Gains en Ps :: en % :	Gains en Nt :: abs :	Gains en Nt :: en % :
0	: 27I	: 8,6	: 6,8	::	:	::	:
0	: 274	: 8,5	: 6,6	::	:	::	:
2 mg I7	: 286	: 8,1	: 6,8	::	:	::	:
4 mg 94	: 45I	: 7,9	: 7,0	:: I80	: 67	:: I3,3	: 72
8 mg 68	: 496	: 5,8	: 5,4	:: 222	: 8I	:: 8,8	: 49
I7 mg 36	: 568	: 5,7	: 5,6	:: 294	: IO6	:: I3,8	: 77
34 mg 72	: 555	: 4,9	: 5,5	:: 28I	: IO3	:: I2,4	: 69
69 mg 54	: 587	: 4,9	: 5,6	:: 3I4	: II5	:: I4,9	: 83

L'acide malonique stimule considérablement la croissance ; en moyenne la récolte est doublée; cet effet stimulant se fait sentir à partir d'une concentration M/2.400; il n'y a pas proportionnalité entre la quantité d'acide malonique ajoutée et l'importance des récoltes.

Le rapport glucose consommé/poids sec est fortement abaissé, en moyenne une fois et demie; cet effet se fait sentir nettement à partir de la concentration M/I.200 et le rapport diminue lentement avec l'augmentation de la concentration en acide malonique; les valeurs sont parmi les plus basses que nous obtenions avec cette levure (voir tableaux 26 et 27).

L'utilisation de l'azote nitrique est considérablement accrue. L'azote nitrique est environ I,6 fois plus utilisé en moyenne, comme le montre le tableau des gains en azote du poids sec. Ceci est d'autant plus extraordinaire que nous nous trouvons avec les Frlenmeyer dans des conditions d'aération insuffisante limitant l'utilisation de l'azote nitrique par cette levure (voir tableau I4).

Il y a diminution importante de la teneur en azote des récoltes; elle peut être I,2 fois moindre.

Tous ces effets sont similaires à ceux d'une plus forte aération et on constate une étroite correspondance des phénomènes morphologiques : le voile apparaît en même temps que sur les témoins, mais dès qu'il est ébauché, il s'épaissit rapidement, devient membraneux en même temps qu'il est très grimpant. Il y a élévation cellulaire prononcée et production abondante d'asques.

Evidemment ces résultats ne correspondent nullement à une action attendue de l'acide malonique comme inhibiteur éventuel de la succino-déshydrase observée *in vitro* par QUASTEL et WOOLDRIDGE. Exerçant une action équivalente à celle d'une plus forte aération en présence d'azote nitrique, il est vraisemblable que l'acide malonique intervient, en fait, sur la respiration cellulaire qu'elle stimulerait; on sait qu'on entend par respiration cellulaire non seulement la

consommation d'oxygène, mais l'ensemble des processus de déshydrogénation et de transfert d'hydrogène dont sont responsables des systèmes déshydrasiques; selon WIELAND, THUNBERG, SZENT-GYÖRGI, KREBS et alii, ils constitueraient la partie fondamentale, "système desmolytique", de la respiration cellulaire; WURMSER (1939) montre l'aspect physiologique probable de son fonctionnement ("chaîne respiratoire").

D'autres expériences nous ont permis de faire les observations complémentaires suivantes :

- l'action stimulatrice de la croissance est une action précoce; elle n'est pas plus forte au 4ème jour qu'au troisième; au bout de 7 jours la récolte est la même que pour les témoins.

- l'action de l'acide malonique est proportionnellement plus accentuée en Erlenmeyer où l'aération est médiocre qu'en boîtes de ROUX

- elle s'observe également quand on remplace le glucose par un autre aliment ternaire tel que le glycérol; ceci indiquerait que l'intervention de l'acide malonique affecte, avant tout, la réduction biologique de l'azote nitrique

- avec CANDIDA UTILIS, levure poussant en profondeur et ne donnant pas de voile, dont nous avons vu qu'elle était nettement nitratophile, l'acide malonique est plutôt inhibiteur.

- enfin, nous avons trouvé comme seul élément métabolique précis autre, chez notre levure, que l'acide malonique diminue la production d'alcool en % du Ps.

Nous avons ensuite remplacé le nitrate de sodium par le nitrate d'ammonium à la même concentration, les conditions de milieu et de culture restant les mêmes que précédemment. Durée de culture : 3 ou 4 (°) jours :

TABEAU 29 (HANSENULA ELLIPSOIDOSPORA)

Acide malonique	: Ps	: Gc/Ps	: Nt%Ps	:: Azote ammoniacal ::	Azote nitrique	:
	:	:	:	:: utilisé, en N	:: utilisé, en N	:
	:	:	:	:: absolu : en %	:: absolu : en %	:
O	: 387,2	: 9,0	: 7,45	:: 19,08	: 66	:: 9,71 : 34
O (°)	: 468,6	: 8,5	: 7,3	:: 18,48	: 54	:: 15,72 : 46
M/300	: 508,0	: 6,1	: 7,1	:: 25,9	: 72	:: 10,22 : 28
M/150	: 535,1	: 6,9	: 7,24	:: 27,08	: 70	:: 11,64 : 30
M/150	: 610,1	: 7,7	: 6,76	:: 25,02	: 60	:: 16,25 : 40

L'adjonction d'acide malonique augmente moins fortement les récoltes, 1,38 et 1,3 fois (°) en présence de nitrate d'ammonium que de nitrate de sodium (1,9 fois); cependant, les valeurs finales des récoltes sont sensiblement égales à celles obtenues en présence de nitrate de sodium quand il y a intervention de l'

acide malonique.

Le rapport glucose consommé/poids sec est fortement abaissé, mais moins qu'en présence de nitrate de sodium : 1,3 et 1,5 fois au lieu de 1,7.

L'utilisation de l'azote en total est accrue 1,35 et 1,2 fois au lieu de 1,6 fois avec le nitrate de sodium, donc bien moins fortement. D'ailleurs le tableau 29 nous permet de nous référer aux gains du poids sec en azote nitrique et en azote ammoniacal. Que constatons nous en présence de nitrate d'ammonium? Par rapport au nitrate de sodium (1,6 fois), l'azote nitrique n'est que 1,2 et 1,04 fois plus utilisé. L'azote ammoniacal est proportionnellement plus utilisé que l'azote nitrique sous l'influence de l'acide malonique lorsque nous nous référons aux témoins.

Soulignons cette dernière constatation et référons nous à l'influence de traces d'ammoniaque qui améliorent l'utilisation de l'azote nitrique (tableau 15), il vient immédiatement à l'esprit que l'acide malonique pourrait être un de ces acides intervenant à la fois dans le système " desmolytique " des déshydrogénations et transferts d'hydrogène et dans la protéogénèse au début par les processus si généraux de transamination découverts par BRAUNSTEIN et KRITZMANN. A notre avis, bien qu'on ne connaisse pas d'acide aminé correspondant à l'acide malonique et bien que nous ne disposions pas d'une preuve enzymologique des actions précédentes, il est vraisemblable que l'acide malonique accélère la mobilisation de l'ammoniaque, au cours de réactions d'équilibre biochimiques, et accroît ainsi la protéogénèse; accélérant la mobilisation de l'ammoniaque, produit normal du métabolisme de l'azote nitrique, il accélérerait par récurrence l'utilisation de l'azote nitrique. L'action de traces d'ammoniaque en présence de nitrate de sodium pourrait s'expliquer par le fait qu'elles favoriseraient la production si facile d'acides organiques chez cet organisme, en somme par voie de réaction physiologique. Notons que ce sont là des hypothèses et que, en confrontant les tableaux 15 et 29, on observe, par ailleurs, de bien grandes différences dans les résultats suivant qu'en présence d'azote nitrique on ajoute de l'ammoniaque ou de l'acide malonique.

En présence de nitrate d'ammonium, contrairement à ce qui est observé en présence de nitrate de sodium, la teneur en azote du champignon ne change guère et sur le plan morphologique, en dehors de la formation d'un voile plus important, l'elongation cellulaire est absente ou faible comme nous le constatons habituellement en présence de nitrate d'ammonium.

En résumé, nous avons trouvé que l'acide malonique, dont nous attendions une

action inhibitrice sur la respiration cellulaire (succine-déshydrogène) accélère la réduction biologique de l'azote nitrique chez un *ASPERGILL*. Dans les conditions où l'insuffisance d'oxygène limite l'utilisation de cette substance; que, l'acide malonique agit comme une plus forte aération du milieu de culture tant sur le métabolisme, sur la conversion chimique de l'organisme que sur la morphogénèse; qu'il est vraisemblable, en conséquence, que l'acide malonique intervient dans le fonctionnement du système respiratoire cellulaire en favorisant *OE* fonctionnement.

Enfin et surtout les expériences précédentes confirment les résultats concernant les relations entre l'aération et l'utilisation de l'azote nitrique dans leur action convergente sur le métabolisme et la morphogénèse, mettant en relief l'influence propre de l'azote nitrique, résultats exposés dans la troisième partie de notre présent travail.

F. ACTION DE DIVERS ACIDES ORGANIQUES CHEZ *EUZEMULA ELLIPSOIDOSPORA*.

Les résultats inattendus obtenus avec l'acide malonique nous ont fait nous demander s'il s'agit là d'une action spécifique ou si elle était partagée par d'autres acides intervenant dans un "cycle respiratoire" (*KESS*) ou par des acides dont l'utilisation suppose la déshydrogénation préalable (ce sont les précoécure et aussi de l'acide lactique, de l'acide tartarique). Cette dernière hypothèse était d'autant plus vraisemblable que l'acide malonique a été considéré par *CHALLINGER*, *SUBRAMANIAM* et *WILKES* comme un intermédiaire possible dans la formation de certains de ces acides chez *ASPERGILLUS NIGER*. Mais indépendamment de la suggestion de ces auteurs, nous avons trouvé que l'acide malonique est assimilable par *EUZEMULA EUZEMII*, les *EUZEMULA* et que ses effets morphologiques sont les mêmes que ceux des acides dont nous allons examiner l'action, ce qui montre, une fois de plus, l'importance et l'intérêt de recherches morphologiques avant d'entreprendre l'étude physiologique et biochimique de ces organismes.

Les conditions de milieu et de culture sont les mêmes que pour le tableau 23. La source azotée de base reste le nitrate de sodium. La culture est faite de même dans des Erlenmeyer de 300 cml contenant 100 cml de milieu. La durée de culture est également de 3 jours à partir de l'ensemencement d'une anse d'une culture récente sur milieu *OE* incliné. Les acides suivants sont employés à une concentration 1/100 : citrique, succinique, tartarique, malonique, lactique, acétique :

TABLEAU 30 (HANSENULA ELLIPSOIDOSPORA)

Acide	Ps	Go/Ps	Nt/Ps	Gains en Rs absolu : en %	Gains en Nt absolu : en %	pH
O	274	8,5	6,6	:	:	4,1
O	267	8,3	6,6	:	:	4,1
O	252	9,1	6,3	:	:	4,1
Nitrique	670	4,7	6,1	407 : 154	24 : 141	4,6
Succinique	602	5,3	5,5	338 : 128	16 : 94	4,6
Malonique	600	5,2	6,1	336 : 127	19 : 112	4,3
Actique	587	4,9	5,6	"314" : "115"	"15" : "83"	4,3
Acétique	411	5,1	5,6	147 : 56	6 : 35	4,4
Acétique	364	6,8	6,7	100 : 38	7 : 41	4,4

Les résultats sont analogues à ceux obtenus avec l'acide malonique qui figure sur ce tableau.

Les récoltes sont fortement augmentées par rapport aux témoins; elles sont classées par ordre décroissant; c'est un acide tricarboxylique qui donne la plus forte récolte; ce sont deux acides monocarboxyliques qui donnent les plus faibles.

Le rapport glucose consommé/poids sec est fortement abaissé sauf en présence d'acide acétique.

L'utilisation de l'azote nitrique (gain en Nt) est accrue à peu près dans l'ordre des récoltes.

Les teneurs en azote sont nettement diminuées sauf en présence d'acide acétique.

Les réactions morphologiques sont analogues à celles observées en présence d'acide malonique.

L'acide oxalique, au contraire, en présence de nitrate de sodium, freine la croissance, s'oppose à la production du voile.

Nous avons trouvé, dans la littérature, un autre exemple de la stimulation de la croissance sous l'influence de certains des acides organiques précédents : nitrique, succinique, etc..., acide malonique excepté. Avec une concentration nettement supérieure, en présence d'une source azotée ammoniacale, LEONIAN et LILLY trouvent un accroissement considérable des récoltes de Mucoracées; mais ils ne trouvent aucune stimulation en présence de nitrate de sodium. Il est bien évident que ces réactions à l'action des acides organiques précités contribuent à définir le type métabolique des HANSENULA, des Mucoracées et peut-être d'autres groupes de champignons.

COMPARAISON DES RESULTATS EXPOSES DANS LA QUATRIEME PARTIE.

La comparaison de l'action de ces diverses substances : cystéine, aneurine, fluorure de sodium, acide malonique, acides organiques autres, en présence de nitrate de sodium, nous donne les renseignements suivants :

1° A part l'aneurine, il ont tous une action sensible déjà à une concentration M/I.200 dans le milieu. On ne peut cependant en déduire la concentration intracellulaire normale par exemple de certains acides organiques; tout au plus peut-on supposer qu'elle est faible.

2° L'emploi du nitrate de sodium comme source azotée de base et de champignons exiccants et sensibles du point de vue aération fait ressortir au maximum leur action; c'est notamment le cas pour la cystéine, l'aneurine, le fluorure de sodium, l'acide malonique.

3° Vis à vis de l'utilisation de l'azote nitrique par les champignons, leur influence est très différente : la cystéine permet une meilleure utilisation de l'azote nitrique par une forme profonde, chlamydosporée de *PULLULARIA PULLULANS* qui n'est pas adaptée à l'utiliser; l'aneurine est au contraire antagoniste de l'azote nitrique chez un *HANSENULA* en agissant comme le ferait une diminution d'aération; l'acide malonique accroît considérablement l'utilisation de l'azote nitrique même dans des conditions de faible aération qui limitent normalement cette utilisation.

4° L'intervention de ces substances accentue l'opposition entre azote nitrique et azote ammoniacal dans leur action sur le métabolisme et la morphogénèse.

5° Cette intervention, notamment de la cystéine, de l'aneurine, de l'acide malonique permet de confirmer que l'azote nitrique stimule la consommation aérobie du glucose.

6° Cette stimulation est à rapprocher de celle de la progression centrifuge du cytoplasme qui s'obtient également par une plus forte aération.

7° L'emploi enfin de ces différentes substances permet de reconnaître la nature de l'action physiologique convergente de facteurs indépendants lorsque, comme dans le cas de l'acide malonique, elles paraissent intervenir sur le métabolisme intermédiaire et plus précisément sur le système respiratoire cellulaire. Il ressort en effet que le métabolisme intermédiaire est " adaptatif " chez ces organismes essentiellement plastiques et dans le développement morphologique desquels la progression centrifuge du cytoplasme a un rôle fondamental.

INTERPRETATION DES RESULTATS ET DISCUSSION

L'examen de corrélations entre la morphogénèse et le métabolisme chez quelques champignons cultivables et de structure morphologique relativement simple nous a conduit à des résultats que nous avons analysés et interprétés dans leur détail. Nous allons maintenant considérer ces résultats dans leur ensemble et voir quelles réponses nous pouvons apporter aux questions suivantes :

- quels processus morphologiques interviennent dans le développement et la différenciation de ces champignons ?
- quel est le mécanisme de l'action du milieu sur ces processus ?
- quelle est leur nature physiologique ?

A).- PROCESSUS MORPHOLOGIQUES INTERVENANT DANS LE DEVELOPPEMENT ET LA DIFFERENCIATION/

En observant le développement d'un grand nombre de champignons, nous avons retenu comme un processus essentiel à la base de leur développement, de leur organisation et de leur différenciation morphologique, la "progression centrifuge du cytoplasme".

La croissance des champignons est terminale (REINHARDT) et leurs thalles s'étendent constamment par leur partie périphérique; tout paraît donc se passer comme s'il y avait déplacement continu du cytoplasme au cours duquel il semble quitter les parties les plus anciennes pour s'accumuler dans les parties les plus jeunes et périphériques du thalle. Cette progression se dégage, en certains cas, très nettement de l'ensemble des courants du cytoplasme, mais elle ne saurait cependant être identifiée à une "migration", terme adopté depuis les travaux de BULLER et conception généralisée par M. LANGERON; nous reviendrons sur ce point si important lorsque nous examinerons la nature physiologique de ce phénomène.

Bien que les courants cytoplasmiques soient d'une étude particulièrement difficile chez les levures, nous avons pu cependant mettre en évidence chez elles une "progression centrifuge" du cytoplasme :

- leur bourgeonnement, en effet, à un siège défini et il est orienté; il se produit au voisinage de l'extrémité distale de la cellule mère et il s'ensuit que les cellules, issues les unes des autres, se disposent suivant un sens centrifuge.
- tout se passe comme si les cellules les plus âgées se déshabitaient de leur cytoplasme au profit des cellules jeunes et distales au cours de cette extension. Quand ceci est précoce et rapide, on ne peut rapporter cette disparition

parfois presque complète du cytoplasme des cellules les plus âgées à une dégénérescence locale, car on y trouve un " cytoplasme résiduel " bien vivant puisqu'il peut être à l'origine de processus morphologiques consécutifs à la progression centrifuge du cytoplasme : conjugaison, ascosporeulation, chlamydo-sporeulation.

- quand elle est accentuée, il y a en même temps " élongation cellulaire " qui consiste en un allongement membranaire sans modification de calibre de la cellule; rappelons que cette élongation cellulaire est surtout évidente, bien qu'inconstante, chez les levures blastosporées; elle ne s'observe pas au niveau de cellules jeunes en pleine multiplication.

La progression centrifuge du cytoplasme est mieux connue chez les champignons filamenteux où elle se manifeste :

- directement non seulement dans l'extension mycélienne, mais dans le développement d'un appareil sporifère aérien

- indirectement par les phénomènes morphologiques qui lui font suite et dont on trouve, comme chez les levures, l'origine dans le cytoplasme résiduel en amont : production d'anastomoses, formation de spores de conservation, etc...

On comprend ainsi le rôle très important, direct et indirect, de la progression centrifuge du cytoplasme non seulement dans la croissance et l'extension des champignons, mais dans leur différenciation morphologique.

Sa connaissance nous permet aussi de trouver une relation entre les aspects macroscopiques du " développement par rapport à la surface des milieux " et les phénomènes morphologiques microscopiques. Ainsi nous pouvons distinguer :

- des champignons à " développement extensif " qui présentent soit une forme relativement fixe (*GEOTRICHUM CANDIDUM*), soit une différenciation très précoce et facile (*CANDIDA HUMICOLA*, etc.), avec une progression centrifuge du cytoplasme et une élongation membranaire très prononcées. Souvent ces organismes ont une tendance au développement spontané en profondeur (immersion) comme si le champignon devait se soustraire à l'action de l'espace aérien surmontant le milieu de culture. Le cas des " thalles immergés " est d'ailleurs particulièrement intéressant : nous trouvons presque tout le cytoplasme à l'extrémité distale des filaments mycéliens ou pseudo-mycéliens plongeant dans la gélose et nous sommes frappés, en même temps, par le fait que ces éléments immergés, donc soustraits à l'action de l'oxygène, présentent des caractères morphologiques : pigmentation et présence d'enclaves lipidiques, etc., observés normalement au cours du développement en aérobiose.

- des champignons formant des " colonies ou des thalles à croissance limitée " La différenciation morphologique peut s'échelonner d'un état de " réduction morphologique " où la progression centrifuge du cytoplasme est faible jusqu'à un état

de levure filamenteuse (HANSENULA ELLIPSOÏDOSOMA, etc...) ou de champignon filamenteux (PULLULARIA PULLULANS, etc...) où cette progression est très accentuée.

L'expérimentation confirme d'ailleurs ces distinctions : en réduisant cette progression centrifuge, nous obtenons des états de convergence levuriforme, en l'accentuant des états de convergence filamenteuse ressortant avec évidence dans le cas de thalles immergés.

B).- MECANISME DE L'ACTION DU MILIEU .

Beaucoup des champignons que nous avons étudiés sont des organismes très plastiques et susceptibles en même temps de s'adapter physiologiquement à des milieux physiquement et chimiquement très différents. Chez eux, le milieu extérieur agit directement sur la matière vivante, donc sur le cytoplasme, car il n'y a pas de " milieu intérieur ". D'autre part, ils ne possèdent pas de système méristématique différencié orientant la croissance et la différenciation cellulaire; ceci n'exclut pas cependant des processus de " régulation cytoplasmique " tels qu'on en a reconnu au cours de la production de phialospores et que nous en avons observés au cours du " polybourgeonnement distal " chez les levures.

Nous ne considérons ici que les modifications réversibles de forme dépendant de l'intensité et de l'orientation de la progression centrifuge du cytoplasme; nous laissons donc de côté les modifications de forme obtenues au cours de longues évolutions ainsi que sous l'action du milieu vivant (par exemple phénomènes parasitaires) parce qu'elles sont trop difficiles à étudier par des moyens expérimentaux ordinaires, les modifications de forme du fait de mutations.

Les champignons sont sans exception des organismes aérobies; PASTEUR (1876) montre^{nt} que des traces d'air sont nécessaires pour permettre, chez des levures^{et DENYS COCHIN} zymatiques, la multiplication cellulaire avant le déclenchement des processus fermentaires. Ceci s'observe aussi nettement avec des levures azymatiques formant un voile (GEOTRICHUM CANDIDUM, CANDIDA HUMICOLA, etc...), la quantité d'oxygène introduite dans le milieu étant insuffisante pour permettre la respiration. En raison de la formation éventuelle, mais nette, d'un voile mince dans ces conditions, nous pensons que l'action première de l'oxygène est de permettre le déclenchement des courants cytoplasmiques et la progression centrifuge du cytoplasme.

L'intensité de cette dernière augmente avec l'aération; nous nous en rendons compte non seulement par les observations microscopiques, mais par des modifications de la composition chimique de l'organisme entier et notamment, dans la majorité des cas, par une diminution de sa teneur en azote total; celle-ci témoigne

aussi de l'élongation membranaire qui s'accompagne, nous l'avons vu, d'une accentuation du phénomène précédent et augmente, comme elle, avec l'aération. En somme, la diminution de la teneur en azote traduit une diminution de la densité du cytoplasme et nullement une dégénérescence de ce dernier dans nos expériences; elle correspond donc à une tendance extensive en fonction de la progression centrifuge du cytoplasme et de l'élongation membranaire. La production de voile est une manifestation équivalente à cette "progression centrifuge" en tant que "migration massive des cellules vers la surface des milieux". Dans cette production de voile on pourrait dissocier, quoique imparfaitement, la part de la diminution de la teneur en azote qui revient à la "progression centrifuge du cytoplasme" phénomène premier, de celle qui revient à l'élongation cellulaire, apparaissant secondairement; mais ceci ne présente qu'un intérêt mineur, puisque, dans les conditions de nos expériences, le deuxième phénomène est lié au premier. Ce qui nous paraît être beaucoup plus important, c'est un certain parallélisme entre les faits suivants : les champignons, tels que *GEOTRICHUM CANDIDUM*, à forme relativement fixe, *CANDIDA HUMICOLA* différencié très précocément et facilement, sont médiocrement aérobies et on obtient, avec une aération relativement faible, leur croissance et leur tendance extensive maximum; au contraire, chez des organismes tels que *HANSENUA* et surtout *PULLULARIA PULLULANS*, la croissance, la tendance extensive et la différenciation morphologique augmentent avec l'aération.

Tels sont certains rapports entre la morphogénèse et le métabolisme chez divers champignons cultivables sous l'influence de l'aération. Leur considération amène évidemment à se demander comment des organismes aérobies le sont cependant médiocrement; il est évident que la quantité d'oxygène (nous n'en avons qu'une idée approximative) dont disposent *GEOTRICHUM CANDIDUM* et *CANDIDA HUMICOLA* dans des fioles non agitées (tableaux III, IV et V) comparée à la quantité relativement importante de glucose consommé, montre qu'une grande partie de celui-ci ne sert pas à une utilisation respiratoire; rappelons, à cet égard, l'importance des données quantitatives de *PLANTEFOL* d'où il ressort que l'intensité respiratoire varie considérablement suivant les espèces. Nous constatons que *GEOTRICHUM CANDIDUM* et *CANDIDA HUMICOLA*, contrairement à *HANSENUA* et d'ailleurs aux *SACCHAROMYCES* font virer assez rapidement le vert Janus et même le rouge neutre dans des conditions d'aération médiocre; ceci semble indiquer que ces organismes ont un "pouvoir réducteur puissant" contrastant avec leur faible intensité respiratoire probable. Remarquons encore que, de façon générale, le "pouvoir réducteur" des champignons augmente avec l'aération; en effet, dans les tubes de fermentation il y a seulement

décoloration du bleu de méthylène. Nous verrons, d'ailleurs, un aspect physiologique de ce pouvoir réducteur augmentant avec l'aération à propos de l'utilisation de l'azote nitrique.

Un autre aspect des relations entre la morphogénèse et le métabolisme en fonction du milieu nous est fourni par l'action d'aliments ternaires autres que les sucres fermentescibles, notamment ceux qui sont excrétés dans le milieu au cours de la fermentation alcoolique, c'est à dire les alcools et les acides organiques; leur utilisation, dont on a reconnu qu'elle ne peut être que respiratoire (par exemple travaux de MARKOVIC), exige en effet une aération plus forte que celle du glucose. Les acides organiques favorisent hautement la production de voile et la progression centrifuge du cytoplasme ainsi que les manifestations qui s'y rattachent.

L'étude de l'action de diverses substances azotées nous a montré que certaines d'entre elles, la tyrosine et la leucine, agissent comme une plus forte aération sur le " développement par rapport à la surface des milieux ", la " progression centrifuge du cytoplasme ", la différenciation morphologique et la pigmentation. La cystéine agit de façon inverse. Le glyocolle, tout en donnant une bonne croissance, restreint la progression centrifuge du cytoplasme, l'élongation cellulaire et agit dans le même sens que les hautes teneurs en azote qui élèvent la teneur en azote des récoltes.

Le nitrate de sodium agit sur la morphogénèse et la différenciation morphologique comme une plus forte aération; à la suite de cette constatation première, nous avons pu dégager les faits physiologiques et métaboliques suivants :

- l'utilisation du nitrate de sodium augmente avec l'aération et, chez HANSENULA ELLIPSOIDOSPORA, en atmosphère confinée, la récolte est beaucoup plus faible qu'avec toute autre source azotée.

- les organismes, entraînés en très faible aération, sont mal adaptés à utiliser l'azote nitrique lorsqu'ils sont replacés dans des conditions d'aération plus forte; cette constatation est particulièrement nette dans le cas de PULLULARIA PULLULANS par comparaison avec d'autres sources azotées.

- le nitrate de sodium sensibilise, tant au point de vue morphologique que métabolique, les champignons à l'action de l'oxygène.

- la fermentation alcoolique en anaérobiose est nulle ou très faible et tardive en présence de nitrate de sodium avec les levures nitratophiles, l'azote nitrique étant bien entendu la seule source d'azote.

- la production d'alcool en p. 100 du poids sec est bien moindre, chez HANSENULA, en présence de nitrate de sodium qu'en présence de nitrate d'ammonium.

chez les champignons azyamiques et notamment chez *PULLULARIA PULLULANS* le rapport glucose consommé/poids sec est beaucoup plus élevé en présence de nitrate de sodium que de toute autre source azotée.

Sur ce dernier point, il y a une différence essentielle avec l'influence d'une plus forte aération puisque celle-ci rend la croissance plus économique en diminuant la consommation relative de glucose. TERROINE et WURMSER (1922) montrent la nécessité d'une plus forte consommation de glucose en présence d'azote nitrique pour permettre sa réduction, mais elle dépasse de beaucoup celle qui est nécessaire pour fournir l'énergie nécessaire par cette réduction. JACQUOT (1938) reprend cette question avec *ASPERGILLUS NIGER* : l'excès de glucose consommé correspond à une production d'acides organiques et plus tardivement d'acide oxalique; ces réactions seraient les manifestations d'un pouvoir tampon cellulaire contre l'alcalinisation du milieu. Dans nos expériences, de courte durée, le pH se maintient normalement dans la zone acide et généralement il n'est guère modifié en présence de nitrate; il y a production de gaz carbonique et d'acides organiques avec *HANSENIA*; toutefois, le maintien dans la zone acide tient surtout à la composition de nos milieux bien tamponnés vis à vis d'une alcalinisation. Si on confronte les données morphologiques, physiologiques et métaboliques concernant l'assimilation de l'azote nitrique, nous arrivons à une explication différente des faits observés et qui est la suivante : la réduction de l'azote nitrique fait augmenter la consommation de glucose, cette consommation, pour avoir son effet énergétique maximum, entraîne une consommation supplémentaire d'oxygène; cet oxygène stimule la "respiration cellulaire" qui comprend, suivant les conceptions de WIELAND, THUNBERG, SZENT-GYORGII, KREBS et alii, non seulement la consommation d'oxygène, mais l'ensemble des processus de déshydrogénation et de transfert d'hydrogène appelé "chaîne de molytique" ou, sur le plan physiologique, "chaîne respiratoire" (WURMSER 1939), le fonctionnement accru ou stimulé de cette "chaîne" entraînerait, par voie de concurrence, une consommation plus forte d'oxygène, et, par suite, de glucose. Cette nouvelle conception du mécanisme d'action de l'azote nitrique, stimulant la consommation "aérobie" du glucose, sans pouvoir être démontrée directement in vivo, nous a guidés vers les expériences décrites dans la quatrième partie et dont les résultats justifient qu'au moins nous ayons présenté cette théorie avec, bien entendu, toutes les réserves qui s'imposent lorsqu'il n'y a pas démonstration directe.

Un autre facteur influence considérablement la morphogénèse et le métabolisme, c'est la restriction en azote du milieu qui limite évidemment, de son fait,

la protéogénèse et la multiplication cellulaire, mais elle accentue considérablement l'élongation cellulaire et la progression centrifuge du cytoplasme : elle provoque, en même temps, l'immersion dans les milieux de culture comme si le champignon devait "se soustraire à l'action de l'oxygène"; ceci nous a fait penser que la restriction en azote sensibilisait le champignon à l'action de l'oxygène et aussi que les réactions devaient être différentes, sur le plan métabolique, suivant que les champignons sont exigeants du point de vue aération ou non. En effet, nous constatons que les effets de la restriction en azote sont beaucoup plus forts chez les premiers : diminution plus rapide de la teneur en azote de la récolte, élévation du taux de consommation du glucose, lipogénèse et pigmentogénèse accrues, effets similaires (sauf en ce qui concerne la consommation de glucose) à ceux qu'entraîne une plus forte aération. Nous confirmons ainsi les rapports entre la diminution de la teneur en azote du champignon et les phénomènes de progression centrifuge du cytoplasme ainsi que d'élongation cellulaire et aussi certains caractères aérobies du métabolisme de "thalles immergés" pourtant soustraits à l'action directe de l'air. L'élévation du taux de consommation de glucose nous paraît dépendre ici du fait que l'organisme freiné dans sa croissance, mais demeuré vivant, continue d'utiliser le glucose. Le rapprochement de ces diverses constatations nous suggère l'hypothèse que la restriction en azote stimulerait la respiration cellulaire d'une façon indirecte, entendant par respiration cellulaire non seulement la consommation d'oxygène, mais l'ensemble des processus de déshydrogénation et de transfert d'hydrogène dont WURMSER (1939) donne un schéma de fonctionnement (chaîne respiratoire); il semble que, dans certains cas, ces derniers processus pourraient prédominer, les déshydrogénations étant compensées par la synthèse de corps réduits; mais, répétons le, il s'agit là d'une hypothèse en faveur de laquelle nous trouverons, il est vrai, d'autres arguments, mais que nous n'avons pu démontrer directement.

L'ensemble de nos recherches, chez des champignons cultivables sur milieux synthétiques, donne donc les résultats suivants sur les rapports entre la morphogénèse et leur métabolisme:

- des champignons à tendance extensive précoce, différenciés d'emblée ou rapidement, sont moins exigeants et sensibles du point de vue aération et réagissent moins fortement à l'action de la restriction en azote du milieu.
- chez les champignons exigeants et sensibles au point de vue aération, la différenciation morphologique augmente avec l'aération et peut être considérable

depuis un certain "état de réduction morphologique monomorphe et à éléments dissociés" jusqu'à celui de champignon filamenteux polymorphe, et ils réagissent fortement à l'action de la restriction en azote du milieu.

- le nitrate de sodium, chez ces derniers, agit sur la morphogénèse et le métabolisme comme une aération plus forte; l'élévation du taux de consommation de glucose (alors qu'une meilleure aération le fait diminuer) se rapporte à une accentuation de son métabolisme "aérobie", dont nous apportons diverses preuves, en présence d'azote nitrique.

- la restriction en azote, en s'opposant au développement d'un appareil sporifère aérien et à la production de voile, accentue l'extension par élongation cellulaire et stimulation de la progression centrifuge du cytoplasme qui paraît fuir l'oxygène en même temps qu'il y a augmentation de la consommation relative de glucose.

- il y a donc une certaine convergence d'action du facteur aération et du facteur azoté sur la progression centrifuge du cytoplasme.

Ceci nous a fait nous demander si l'oxygène n'agit pas en réalité sur le métabolisme glucidique par l'intermédiaire du facteur azoté puisque, à travers l'action du facteur azoté, nous retrouvons celle de l'oxygène. Aussi, avec les champignons les plus sensibles et les plus exigeants au point de vue aération, avons nous employé comme source azotée le nitrate de sodium qui les sensibilise le plus à l'action de l'oxygène pour observer si l'addition de traces de substances ayant une influence biochimique connue ne modifiait pas la croissance, la consommation de glucose en même temps que l'utilisation de l'azote nitrique. Nous avons conçu cette méthode parce que théoriquement le nitrate de sodium, agissant comme une meilleure aération, doit, selon nous, "ouvrir l'éventail desmolytique" et, par conséquent, des actions de traces de substances agissant sur le métabolisme intermédiaire doivent être amplifiées et ressortir avec netteté; disons tout de suite que cette conception théorique de départ s'est trouvée en accord avec les faits expérimentaux; nous considérons, comme une des parties les plus importantes de nos résultats, d'avoir créé une méthode faisant ressortir au maximum l'action physiologique de facteurs oligodynamiques. Parmi ces facteurs, nous avons choisi la cystéine parce que, par ses effets opposés à ceux de l'azote nitrique, elle abaisserait le niveau général des processus d'oxydo-réduction cellulaire (notion qui résulte de travaux de maints auteurs sur l'influence de la cystéine et le rôle du groupe sulfhydryle), l'ammoniaque parce que, source azotée réduite, elle est en même temps un produit du métabolisme de l'azote nitrique comme nous avons pu

à vérifier, l'ancurine parce que, contrairement au nitrate de sodium, elle favorise évidemment la fermentation alcoolique, enfin le fluorure de sodium et l'acide malonique parce que ce sont des inhibiteurs enzymatiques connus in vitro respectivement au cours du catabolisme du glucose et du fonctionnement du système osmolytique (inhibition de la succino-déshydrase). Par ces expériences nous vérifions, en même temps, si des modifications métaboliques entraînent bien les changements morphologiques attendus conformément aux recherches premières où nous sommes partis, au contraire, de variations morphologiques pour rechercher des modifications correspondantes du métabolisme et de la composition chimique des organismes; c'est là une manière de contre-épreuve expérimentale. Les deux champignons choisis et utilisés sont *PULLULARIA PULLULANS* et *HANSENULA ELLIPSOIDOSPOREA*.

La cystéine a une action généralement contraire de celle de l'azote nitrique chez les champignons en s'opposant à la production de voile et à la progression centrifuge du cytoplasme, à l'élongation cellulaire. Chez *PULLULARIA PULLULANS*, la cystéine en très faible quantité ajoutée au nitrate de sodium abaisse le taux de consommation de glucose en l'amenant à la valeur trouvée en présence d'une source ammoniacale ou aminée, ce qui prouve que le taux de consommation de glucose plus élevé en présence de nitrate est fortement excédentaire si on le rapporte simplement à la nécessité de la réduction de l'azote nitrique. En même temps; la cystéine améliore la croissance de la forme chlamydosporée profonde mal adaptée à se développer en présence de nitrate tandis qu'elle restreint celle de la forme *DEMATIUM* bien adaptée et qui est plus aérobie. Nous pensons que, dans le cas de la forme chlamydosporée, la cystéine rend le niveau des oxydo-réductions cellulaires compatible avec l'utilisation de l'azote nitrique.

Avec *HANSENULA ELLIPSOIDOSPOREA*, l'adjonction d'ancurine à un milieu nitrate et sodium-glucose diminue fortement la croissance, élève considérablement le taux de consommation de glucose et la production d'alcool en p. 100 du poids sec, freine l'utilisation de l'azote nitrique en même temps qu'elle augmente la teneur en azote; sur le plan morphologique elle restreint la production de voile et la progression centrifuge du cytoplasme ainsi que l'élongation cellulaire. En quelque sorte, l'effet de l'ancurine est antagoniste de celui de l'azote nitrique en créant des conditions favorables à la fermentation alcoolique par cette levure; ceci renforce l'interprétation que nous avons proposée du mécanisme d'action de l'azote nitrique sur le métabolisme glucidique et sur la morphogénèse.

Par contre, le fluorure de sodium, substance toxique, a une action trop complexe, au milieu de culture, pour pouvoir l'interpréter; indiquons simplement qu'en

surajoutant de l'ancurine, on a une action intriquée et que le fluorure est complètement inhibiteur en présence de traces d'acide malonique.

Contrairement à toute attente et loin d'exercer un effet inhibiteur, l'acide malonique stimule initialement la croissance de HANSENULA d'une façon surprenante même lorsqu'il est ajouté en quantités très faibles au milieu de culture sans que l'action observée soit proportionnelle à la quantité d'acide ajoutée. Il fait abaisser considérablement le taux de consommation de glucose et diminue la production d'alcool en % du poids sec. Il favorise hautement l'utilisation de l'azote nitrique même dans des conditions où l'insuffisance d'aération limite cette utilisation. Il diminue fortement la teneur en azote du champignon. Ces données biochimiques montrent son action convergente avec celle d'une forte aération sur le métabolisme et sur la composition chimique de l'organisme. Nous trouvons corollairement une plus forte production de voile, une progression centrifuge du cytoplasme et une élongation cellulaire encore plus accentuées qu'en présence de nitrate de sodium seul. Ces mêmes effets remarquables sont obtenus lorsque nous remplaçons l'acide malonique par l'acide citrique, l'acide succinique, etc...; avec ces derniers acides LEONIAN et LILLY ont fait une observation analogue chez des Mucoracées, mais en employant une source azotée ammoniacale. On est en droit de penser que l'acide malonique intervient dans un "cycle respiratoire" tout comme les précédents et stimule, conformément à la conception de WIELAND, le fonctionnement du système desmolitique dont WURMSER (1939) donne un schéma physiologique ("chaîne respiratoire") qui nous a servi de guide expérimental. De ce fonctionnement dépendrait le "pouvoir réducteur" et on comprend comment, indirectement, l'acide malonique favorise la réduction biologique de l'azote nitrique même quand l'aération est faible.

Qu'il s'agisse de cystéine, d'ancurine, de fluorure de sodium, d'acide malonique, nous observons que leur action est différente soit dans sa nature propre, soit seulement dans son intensité quand nous substituons l'azote ammoniacal à l'azote nitrique. Nous avons décrit ces différences et elles soulignent encore l'influence propre de chaque substance azotée tant sur le métabolisme et la composition chimique des champignons étudiés que sur leur morphogénèse en fonction des conditions d'aération.

A ce point de vue, HANSENULA ELLIPSOÏDOSPORA offre une particularité étonnante : d'emblée le nitrate d'ammonium constitue une source azotée mixte pour cette levure qui utilise très facilement l'azote nitrique, presque aussi facilement que l'azote ammoniacal (voir tableau XXIX) alors qu'en règle générale, chez les autres champignons (PULLULARIA PULLULANS par exemple), il y a utilisation préférentielle

de l'azote ammoniacal et c'est seulement lorsque celui-ci est épuisé que commence celle de l'azote nitrique. En ajoutant, chez HANS ENULA, des traces d'ammoniaque à un milieu nitrate de sodium-glucose, même dans des conditions où l'insuffisance d'oxygénation freine l'utilisation de l'azote nitrique, nous voyons que celle-ci est accrue et que la croissance est améliorée (tableau XVI). L'ammoniaque, produit du métabolisme de l'azote nitrique, agit par récurrence sur le métabolisme de son produit d'origine en créant de nouvelles conditions à ce métabolisme. Remarquons qu'une considération analogue s'applique aux acides organiques produits chez HANS ENULA au cours du métabolisme du glucose en présence d'azote nitrique; on peut expliquer ainsi comment il continue à être utilisé et servir à la croissance alors que l'atmosphère est de plus en plus confinée en Erlenmeyer; en effet, l'action stimulante rapportée tant de ces acides organiques que de l'ammoniaque est une action initiale et, au bout de plusieurs jours, les récoltes des témoins rattrapent le retard et elles sont similaires à celles où il y a eu addition au départ de ces substances.

L'ensemble de ces résultats contribue à définir " le type métabolique " des organismes étudiés. Il montre la difficulté qu'il y a à le faire; il y a autant de types particuliers que d'organismes et même de souches. Il est probable que certaines de ces réactions se retrouveraient chez d'autres organismes que ceux que nous avons étudiés, mais ils peuvent aussi en présenter d'autres entièrement différentes et nous nous gardons soigneusement de vouloir généraliser la portée de nos résultats sauf peut-être sur un point: l'action du milieu sur la progression centrifuge du cytoplasme dont nous chercherons, maintenant, à reconnaître la nature physiologique.

1.- NATURE PHYSIOLOGIQUE DE LA PROGRESSION CENTRIFUGE DU CYTOPLASME.

Les études de l'action du milieu chez les champignons sont beaucoup moins nombreuses que chez les végétaux supérieurs; chez ceux-ci les travaux des botanistes français (LAURENT, BONNIER, LHOTELIER, MOLLIARD, COMBES, GERTRUDE) ont pu éclairer son mécanisme. Par exemple, ils ont observé des modifications morphologiques identiques (citons la différenciation du tissu palissadique des feuilles) sous l'action de facteurs indépendants (ici : éclaircissement, air sec, culture dans une solution de glucose) et ils trouvent que ces facteurs provoquent une réaction physiologique identique (la pression osmotique qui s'élève); ils établissent en conséquence que la différenciation morphologique varie en fonction de cette réaction.

Nos expériences nous montrent de même que des modifications morphologiques

communes (accentuation de la progression centrifuge du cytoplasme, élongation cellulaire) sont obtenues par l'action de facteurs indépendants (en l'occurrence aération accrue, nitrate de sodium comme source unique d'azote, restriction ou carence en azote du milieu de culture, intervention de certains acides organiques dont l'utilisation suppose la déshydrogénation ou participant, suivant les théories modernes à un cycle respiratoire); ces facteurs provoquent des réactions physiologiques communes qui consistent notamment et même de façon prédominante, selon nous, en une stimulation de la respiration cellulaire. En somme, comme dans le cas de végétaux supérieurs, une convergence dans l'action morphogène est précédée d'une convergence de l'action physiologique. Il ressort également de nos expériences que l'élément physiologique adaptatif de ces organismes plastiques est leur métabolisme intermédiaire. Nous en apportons la preuve expérimentale quand nous montrons, chez un HANSENULA, une action de l'aneurine antagoniste de celle de l'azote nitrique : l'aneurine favorise alors hautement la fermentation alcoolique et restreint considérablement la progression centrifuge du cytoplasme.

Ainsi, les données à l'origine de nos recherches sont celles que nous a apportées l'observation morphologique du développement de champignons relativement simples et aisément cultivables; nous avons coordonné et systématisé ces observations; nous les avons analysées; nous en avons dégagé un processus physiologique majeur : la progression centrifuge du cytoplasme. Nous avons ensuite fait varier méthodiquement certaines conditions physiques et chimiques du milieu et nous constatons que nous modifions l'intensité et l'orientation de cette progression, que nous pouvons changer ainsi l'aspect du développement par rapport à la surface des milieux de culture, que nous pouvons créer ainsi certains états de convergence. Nous analysons ces nouveaux résultats, ils nous font présumer qu'il y a un certain parallélisme entre une action sur la progression centrifuge du cytoplasme et une action sur le métabolisme intermédiaire, plus précisément sur la respiration cellulaire. Nous faisons de nouvelles expériences (quatrième partie) où nous agissons, d'après les théories expérimentales modernes, sur cette respiration cellulaire et nous obtenons une modification de la progression centrifuge du cytoplasme, du développement par rapport à la surface du milieu, de la différenciation morphologique; ainsi, ces expériences apportent une confirmation de l'hypothèse énoncée et constituent une contre-épreuve pour les premières.

On voit par là l'importance et l'intérêt des "tests morphologiques" sur le plan des recherches physiologiques, bien que les biochimistes, plus spécialement en matière de bactéries et de champignons, ne s'en préoccupent guère. L'import-

tance, au contraire, que nous leur attribuons, nous permet de contribuer à essayer de résoudre ce problème : quelle est la nature physiologique de la progression centrifuge du cytoplasme ?

Contrairement à nos prédécesseurs, nous nous sommes bornés à décrire ce processus en nous en tenant strictement aux faits d'observation et d'expérimentation. Rappelons en effet que la notion antérieure de "migration périphérique du cytoplasme" est née des travaux de BULLER, a été généralisée et vulgarisée par M. LANGERON sur des présomptions plutôt que sur des preuves morphologiques et, en tout cas, en l'absence de données expérimentales; on doit donc parler d'une "théorie de la migration périphérique du cytoplasme" à laquelle les auteurs lient, c'est leur argument majeur, la croissance terminale et centrifuge des champignons.

Le phénomène de croissance terminale est très anciennement connu : il se retrouve chez des bactéries aérobies sous un aspect assez voisin de celui que nous avons décrit chez les levures en dehors du fait que, chez les bactéries, il n'y a jamais multiplication par bourgeonnement; il est observé chez les algues et chez un certain nombre de végétaux (observations notamment de CHADEFAUD).

CHOUARD montre que, chez l'ensemble des végétaux, on peut dissocier dans leur accroissement des processus de mèrese au niveau des parties les plus jeunes et des processus subséquents d'auxèse dont l'élargissement membranaire est un type.

Les observations précises de CHADEFAUD sur certaines cellules terminales d'Ascomycètes montrent une plus grande densité du cytoplasme à leur niveau et principalement autour du noyau; de telles observations se répètent dans le cas d'autres végétaux.

Du fait donc d'une plus grande densité cytoplasmique au niveau de cellules jeunes et terminales et d'une moindre densité au niveau de cellules en amont et plus âgées n'est donc pas en soi un argument pour "une migration du cytoplasme", mais prouve seulement un déplacement des points d'accroissement des thalles avec progression centrifuge du cytoplasme jeune.

D'ailleurs admettre la migration pure et simple du cytoplasme, c'est admettre sa translation pure et simple, son déplacement massif, l'identité du cytoplasme trouvé à une étape ultérieure de l'extension des thalles avec le cytoplasme primitif. C'est insoutenable, car, en dehors même de son accroissement, le caractère fondamental de la matière vivante est d'être en perpétuel état de synthèse et de renouvellement, sinon de remaniement, phénomènes internes où le rôle du noyau est fondamental.

Consécutivement à la progression centrifuge du cytoplasme, il reste, au niveau

des éléments mycéliens et pseudo-mycéliens en amont, du cytoplasme résiduel, bien vivant, qui est le siège des processus si importants qui sont également à la base de la différenciation morphologique de ces organismes. La théorie de la migration du cytoplasme méconnaît le rôle si important, direct et indirect, de la progression centrifuge dans la différenciation morphologique.

Les auteurs précédents lient les deux phénomènes : la croissance (terminale et centrifuge) et la migration périphérique du cytoplasme. Nous sommes arrivés à dissocier, avec preuves quantitatives à l'appui, la croissance vraie par protéogénèse et multiplication cellulaire d'une part, l'extension par progression centrifuge du cytoplasme d'autre part. Ainsi le glyccolite et les hautes teneurs en azote du milieu restreignent cette dernière tout en donnant une croissance importante dans certains cas. Par contre, la restriction ou carence en azote du milieu, freinant ipso facto la protéogénèse et la multiplication cellulaire, favorise hautement la progression centrifuge du cytoplasme.

Nous nous devons de rapporter le mécanisme supposé de la " migration " :

- suivant une première hypothèse, le cytoplasme est refoulé passivement sulen un sens centrifuge par distension vacuolaire en amont, cette distension vacuolaire étant liée elle-même à une augmentation de la pression osmotique; ceci serait admissible s'il y avait toujours formation d'une vacuole et rien n'indique non plus qu'une augmentation de la pression osmotique n'est pas une conséquence plutôt qu'une cause.

- suivant une deuxième hypothèse, le cytoplasme est refoulé du fait de son accroissement propre, mais ceci n'explique guère le sens de ce refoulement passif.

Enfin, ces auteurs ne démontrent pas, comme nous l'avons fait, que l'on peut modifier non seulement l'intensité, ainsi que nous l'avons indiqué plus haut, mais l'orientation de la progression centrifuge du cytoplasme dans des expériences de morphogénèse dirigée. Ainsi, nous observons, dans le cas de thalles immergés, que tout se passe comme si le cytoplasme fuyait l'oxygène et nous observons le contraire lorsqu'il y a formation d'un appareil sporifère aérien.

La critique de la théorie de nos prédécesseurs nous permet en même temps d'apporter une nouvelle conception physiologique du processus étudié auquel il faut renoncer d'appliquer la dénomination de " migration ".

Nous constatons que la progression centrifuge du cytoplasme

- est relativement indépendante de la croissance vraie dont on peut la dissocier expérimentalement

- a un point d'application ou siège qui est constamment périphérique et distal

- a une direction centrifuge, mais un sens variable,
- soit vers l'air dans le cas d'udéveloppement d'un appareil sporifère aérien
- soit vers la profondeur dans le cas de thalles immergés

- alors que son apparition peut être déclanchée par des traces d'air, son intensité augmente avec l'aération jusqu'à une certaine valeur de celle-ci qui est variable suivant les organismes. Cette intensité est influencée, non seulement par l'aération, mais par des facteurs qui

- soit sensibilisent éventuellement le champignon à l'action de l'oxygène (restriction ou carence en azote par exemple)

- soit semblent stimuler la respiration cellulaire (par exemple certains acides organiques dont l'acide malonique)

En somme, nous nous trouvons devant un cas de " cinèse polarisée ", comprise entre un seuil et un maximum, où l'intensité de la réaction est liée à celle du stimulus, caractères qui définissent un tropisme.

Tout semble démontrer qu'il s'agit ici d'un oxytropisme (il serait plus correct de dire oxygénotropisme) ou d'une forme particulière d'oxytropisme qui est généralement positif, mais peut devenir secondairement négatif (cas des thalles immergés qui présentent certains caractères de thalles développés en présence d'air)

Il y a lieu de considérer la production de voile par les levures comme un phénomène équivalent d'oxytropisme.

Quant à l'élongation cellulaire des champignons, elle se distingue de celle des végétaux qui est un phénomène d'orientation de la croissance, donc un tropisme classique, où l'auxèse est liée à l'intervention d'hormones; or ici ces hormones n'influencent ni la progression centrifuge du cytoplasme, ni l'élongation cellulaire chez les levures.

Cette conception de la progression centrifuge du cytoplasme, dans le cadre des champignons que nous avons étudiés et choisis pour l'expérimentation, comme un phénomène de tropisme, nous permet déjà de mieux comprendre, sur la base de la confrontation de données morphologiques, physiologiques et biochimiques, comment l'oxygène peut, directement ou indirectement, influencer si profondément la morphogénèse des champignons.

PRINCIPALES CONCLUSIONS.

1).- L'étude de la forme chez les champignons pose non seulement des problèmes morphologiques, mais des problèmes physiologiques. Interviennent en effet

- l'écologie dont le rôle est reconnu dans les phénomènes de convergence au cours de longues évolutions et dans les aspects biologiques de l'adaptation.
- la spécificité se traduisant par la création de types distincts de différenciation morphologique au cours d'une évolution qui peut être très compliquée lorsqu'il y a intervention de cycles en fonction de phénomènes de sexualité, d'étapes intermédiaires dans la constitution de thalles, de passage par un ou des hôtes vivants distincts en cas de phénomènes parasitaires.
- les mutations spontanées dont nous avons vu la fréquence si grande chez les levures que nous sommes conduits à considérer les espèces comme une association de lignées distinctes.

Dans le présent travail, ce sont les modifications réversibles de forme, obtenues au cours d'actions de courte durée du milieu, qui nous préoccupent.

2).- Nous ramenons la description macroscopique de colonies et du thalle à celle du développement par rapport à la surface des milieux de culture. Nous passons en effet, expérimentalement chez un même champignon, de son développement en surface ou au dessus de celle-ci à son développement en profondeur et vice-versa. Donc les aspects macroscopiques des colonies et des thalles sont le témoignage d'une réaction à l'action du milieu.

3).- Cette même étude nous conduit à distinguer :

- des organismes différenciés d'emblée ou précocément, à extension précoce et rapide, à forme relativement stable.
- des organismes dont l'évolution s'échelonne depuis un certain "état de réduction morphologique" monomorphe, à éléments souvent dissociés, avec reproduction par bourgeonnement ou scissiparité jusqu'à l'état de champignon filamenteux différencié avec un certain polymorphisme et une tendance extensive accrue.
- il y a, bien entendu, des cas intermédiaires.

4).- La tendance extensive doit donc être distinguée de la croissance vraie par multiplication cellulaire, bien que dans la plupart des cas les deux processus semblent liés. On trouve comme processus microscopique correspondant essentiellement une progression centrifuge du cytoplasme qui suit étroitement la partie distale et périphérique ou zone d'extension du thalle. Quand cette progression est

accentuée, elle s'accompagne, d'une façon typique chez les levures, d'élongation cellulaire.

5).- C'est le cas notamment lorsque les thalles s'étendent en profondeur de milieux solides en s'éloignant de plus en plus de leur surface (immersion). Le cytoplasme terminal des filaments mycéliens ou pseudo-mycéliens paraît se soustraire à l'action de l'oxygène et on est frappé par le fait que le thalle profond a des caractères (pigmentation, enclaves lipidiques) de thalle développé en surface.

6).- Cette progression centrifuge du cytoplasme se manifeste aussi au cours du développement secondaire d'un appareil sporifère aérien; son orientation est alors inverse de celle trouvée dans le cas précédent.

7).- Consécutivement à ce processus si important, il y a du cytoplasme résiduel dans les éléments mycéliens ou pseudo-mycéliens en amont. Il est à l'origine de processus secondaires également à la base de la différenciation morphologique :

- conjugaison, ascosporeulation, chlamydo-sporeulation chez les levures
 - développement d'anastomoses, formation de spores de conservation, etc...
- chez les champignons filamenteux.

8).- La progression centrifuge du cytoplasme intervient donc directement dans l'extension des thalles, directement et indirectement dans la différenciation morphologique chez les champignons étudiés, indirectement par les processus cytoplasmiques qui lui font suite.

9).- Il se crée des états de convergence en relation soit avec sa diminution (états levuriformes), soit avec l'accentuation de la progression du cytoplasme (états filamenteux, états immergés).

10).- Les expériences de morphogénèse dirigée nous révèlent l'influence considérable de l'aération : elle favorise la progression centrifuge du cytoplasme et crée, en fonction de celle-ci, les aspects du développement par rapport à la surface des milieux.

11).- L'action de l'oxygène peut être déjà sensible à l'état de traces sous ce rapport et il intervient à la manière d'un élément oligodynamique.

12).- Les champignons sont très différemment exigeants et sensibles au point de vue aération. Ceux qui présentent une tendance extensive précoce et rapide sont médiocrement aérobies.

13).- Chez d'autres, la tendance extensive et la différenciation morphologique

augmentent avec l'aération; parallèlement, elle favorise la croissance, la rend plus économique; elle accroît considérablement l'utilisation de l'azote dont la teneur chez le champignon s'abaisse; il y a un rapport défini entre ce dernier fait et une accentuation de la progression centrifuge du cytoplasme. L'aération crée une plus grande diversité d'actions métaboliques (production de pigments par exemple) et en accentue d'autres, comme nous venons de le voir.

14).- Certains champignons sont spontanément adaptés à une aérobie restreinte. Tous ceux que nous avons rencontrés sont azymatiques. Ils conservent, lors de leurs premiers repiquages sur milieux habituels avec une aération convenable, leur "état de réduction morphologique".

15).- D'une part les champignons sont plus ou moins aérobies, d'autre part leurs possibilités d'adaptation à des conditions variables d'aération sont très différentes et l'appréciation de ce caractère contribue à définir leur type métabolique.

16).- Différents produits du métabolisme des glucides, notamment ceux qui sont excrétés au cours de la fermentation alcoolique, peuvent devenir utilisables d'autant mieux que l'aération est plus forte. Parallèlement, leur action sur la morphogénèse est similaire à celle d'une plus forte aération. C'est le cas pour des acides organiques auxquels on attribue un rôle important dans la respiration cellulaire; ils favorisent hautement la production de voile et la progression centrifuge du cytoplasme.

17).- Le facteur qui, après l'oxygène, influence le plus considérablement la morphogénèse, est le facteur azoté qui influence profondément l'intensité et l'orientation du métabolisme glucidique.

18).- Certains acides aminés (alanine, acide aspartique, acide glutamique) sont toujours assimilables et assurent une croissance optimale à la manière des sources azotées complexes. D'autres sont assimilables ou non suivant les champignons et les plus intéressants nous ont paru être la tyrosine, le glycocolle et la cystéine, assimilés par des champignons protéolytiques. La tyrosine accentue la progression du cytoplasme, assure une ascosporeulation abondante et fait apparaître éventuellement la mélanogénèse. Le glycocolle assure une bonne croissance, mais ne favorise pas la tendance extensive, ni par conséquent la progression centrifuge du cytoplasme, ni les processus morphologiques si importants qui lui font suite et dont on trouve l'origine dans le cytoplasme résiduel. La cystéine agit dans le même sens qu'une diminution d'aération.

19).- Certains champignons assimilent l'azote nitrique et son action est similaire sur la morphogénèse à celle d'une plus forte aération. Cette constatation guide les recherches quantitatives et montre sa corrélation avec les faits physiologiques et métaboliques suivants :

- l'utilisation du nitrate de sodium augmente avec l'aération, mais, en plus, chez *HANSENULA ELLIPSOIDOSPORA*, en atmosphère confinée, la récolte est beaucoup plus faible qu'avec toute autre source azotée.

- les organismes entraînés en faible aération sont mal adaptés à utiliser l'azote nitrique lorsqu'ils sont replacés dans des conditions d'aération plus forte; cette constatation est particulièrement nette avec *PULLULARIA PULLULANS* par comparaison avec d'autres sources azotées.

- le nitrate de sodium sensibilise, tant au point de vue morphologique que métabolique, les champignons à l'action de l'oxygène.

- la fermentation alcoolique en anaérobiose est nulle ou très faible et tarde en présence de nitrate de sodium avec les levures nitrato-philés, l'azote nitrique étant bien entendu la seule source d'azote.

- la production d'alcool en % du poids sec est bien moindre, chez *HANSENULA*, en présence de nitrate de sodium que de nitrate d'ammonium

- chez les champignons azymatiques et notamment chez *PULLULARIA PULLULANS* le rapport glucose consommé/poids sec est beaucoup plus élevé en présence de nitrate de sodium que de toute autre source azotée et ceci semble être en rapport avec une stimulation de la consommation aérobie de glucose et de la respiration cellulaire par l'azote nitrique.

20).- Ces dernières hypothèses se vérifient chez *HANSENULA ELLIPSOIDOSPORA*. A un milieu nitrate de sodium-glucose nous ajoutons de l'aneurine : il y a élévation considérable du taux de consommation du glucose et de la production d'alcool. La croissance est par contre fortement diminuée et la production de voile affaiblie. La teneur en azote du champignon est accrue et on obtient une forme blastospore pure sans élongation. L'aneurine diminue fortement l'assimilation de l'azote nitrique et cet effet se maintient alors qu'avec la même levure elle diminue peu la croissance et l'utilisation de la source azotée quand il s'agit de nitrate d'ammonium. L'aneurine a donc une action antagoniste de celle de l'azote nitrique qui est convergente et synergique avec celle de l'oxygène, tant sur le plan morphologique que métabolique.

21).- Chez cette levure, au même milieu de base nous ajoutons de l'acide malonique.

Son action se révèle être identique à celle d'acides organiques intervenant classiquement dans le système respiratoire cellulaire ou dont l'utilisation nécessite classiquement la déshydrogénation. Elle se manifeste avec des traces d'acide malonique et elle n'est pas proportionnelle à la quantité de celui-ci. C'est une action initiale qui se manifeste dès que le voile s'ébauche. Il y a stimulation considérable de la croissance avec production intense de voile. La croissance est beaucoup plus économique. La réduction biologique de l'azote nitrique est fortement accélérée en même temps que la teneur en azote du champignon s'abaisse fortement, ce qui s'accompagne d'une élongation cellulaire très importante. Comme ceci s'observe dans des conditions d'aération relativement insuffisantes qui limitent l'utilisation de l'azote nitrique, on en déduit évidemment que l'acide malonique agit, en présence d'azote nitrique, comme une plus forte aération et se substitue à elle. Il y a, en l'occurrence, convergence d'action morphologique et métabolique d'une plus forte aération et d'un acide organique du type de ceux reconnus comme intervenant dans un système respiratoire cellulaire chez nombre d'organismes.

22).- Des traces d'ammoniac sont également susceptibles, dans ces mêmes conditions de faible aération, d'améliorer la réduction biologique de l'azote nitrique chez cet *HANSENULA*. Il y a là un exemple de produit d'un métabolisme agissant par réurrence sur le métabolisme de son produit d'origine; nous pensons qu'un tel processus est assez général dans les milieux de culture.

23).- Chez les champignons azymatiques, la consommation supplémentaire de glucose trouvée en présence de nitrate de sodium dépasse de beaucoup celle requise pour assurer l'énergie nécessaire à la réduction de l'azote nitrique. Chez *PULLULARIA PULLULANS* de très faibles quantités de cystéine ramènent alors le taux de consommation de glucose à celui trouvé avec une substance ammoniacale ou aminée.

24).- En même temps, chez ce champignon, la cystéine, toujours sur milieu nitrate de sodium-glucose, favorise la croissance, le développement en surface avec production de mycélium et de pigmentation de la forme *chlamydosporée* profonde. Elle freine au contraire la croissance de la forme *DEMATTIUM* de surface. Ceci confirme l'importance et le rôle de la forme ensemencée ainsi que des conditions d'aérobiose antérieure dans l'adaptation à l'utilisation de l'azote nitrique.

25).- La restriction ou carence en azote exerce un effet considérable sur la morphogénèse : l'élongation cellulaire et la progression centrifuge du cytoplasme sont accentuées à l'extrême avec extension précoce en profondeur des milieux de culture tant solides que liquides comme si le champignon devait se dérober à l'

action de l'oxygène. Ceci nous a fait penser que la carence en azote sensibilise le champignon à cette action. Nous constatons en effet que les réactions biochimiques des champignons sont d'autant plus fortes, sous le rapport de la carence en azote, qu'ils sont plus exigeants et plus sensibles au point de vue aération. La restriction en azote fait diminuer rapidement sa teneur chez les organismes, élève le taux de consommation de glucose, favorise la lipogénèse et la pigmentation, effets similaires (sauf en ce qui concerne la consommation de glucose) à ceux d'une plus forte aération et que nous avons déjà reconnu morphologiquement dans le cas de thalles immergés.

26).- L'ensemble de nos résultats fait ressortir

- l'influence considérable du facteur azoté sur le métabolisme glucidique qu'il oriente et son rôle aussi important à cet égard que celui de l'aération
- l'action convergente du facteur azoté et de l'aération sur la morphogénèse et le métabolisme.

27).- L'étude de toutes ces réactions chez des champignons cultivables et de structure relativement simple met en relief l'importance non seulement morphologique, mais physiologique de la progression centrifuge du cytoplasme, son rôle dans l'extension et dans la différenciation morphologique, ses relations avec la croissance vraie et les changements de composition de l'organisme lorsqu'on modifie les conditions de milieu et de culture. Nous précisons ainsi ses caractères et nous pouvons définir sa nature sur les éléments suivants :

- son siège est constamment périphérique et distal
- son apparition peut être déclenchée par des traces d'air et son intensité augmente avec l'aération jusqu'à une valeur limite de celle-ci variable suivant les organismes
- sa direction est centrifuge, mais son sens ou orientation est variable : vers l'air dans le cas de développement d'un appareil sporifère, vers la profondeur dans le cas de thalles immergés
- elle est relativement indépendante de la croissance; ainsi la restriction en azote qui freine inso facto la croissance vraie l'accentue; le glycoColle et les hautes teneurs en azote du milieu ont un effet inverse.

Il s'agit donc d'une " cinèse polarisée ", comprise entre un seuil et un maximum, où l'intensité de la réaction est liée à celle du stimulus, caractères par lesquels on définit un tropisme.

Il s'agit ici d'une forme d'oxytropisme généralement positif, mais qui peut devenir secondairement négatif (thalles immergés).

Cet oxytropisme est particulier, car il peut être influencé

- directement par l'intensité de l'aération
- indirectement par des facteurs qui sensibilisent le champignon à l'action de l'oxygène

Enfin l'action si remarquable de l'azote nitrique, d'acides tels que l'acide succinique et l'acide citrique, le fait morphologique que cette progression se poursuit au niveau de thalles immergés donc soustraits à l'action directe de l'oxygène nous montrent une relation de ce tropisme avec les processus respiratoires cellulaires.

28).- La production de voile est physiologiquement un processus équivalent d'oxytropisme positif.

29).- L'élongation cellulaire des champignons se distingue de celle des végétaux qui est un phénomène d'orientation de la croissance, donc un tropisme classique, où l'auxèse est liée à l'intervention d'hormones. Or ces hormones n'influencent ni la progression centrifuge du cytoplasme, ni l'élongation cellulaire chez les levures.

RESUME GENERAL

Le but du présent travail est la recherche de l'existence et de la nature de corrélations entre la morphogénèse et le métabolisme chez un certain nombre de champignons cultivables. Nous l'avons divisé en quatre parties :

- la première est consacrée à la description de différents aspects macroscopiques et microscopiques du développement.
- la deuxième à l'examen de l'action de modifications des propriétés physiques et chimiques du milieu sur la morphogénèse.
- dans la troisième partie, nous apportons, pour quelques champignons, des indications quantitatives sur des changements de leur métabolisme et de leur composition chimique correspondant à leurs différences d'évolution morphologique.
- dans la quatrième partie, nous modifions le métabolisme de deux champignons par l'addition de traces de substances chimiques au milieu et nous recherchons les changements correspondants de la morphogénèse.
- finalement, dans la partie discussion, nous essayons d'interpréter nos résultats dans leur ensemble sous trois rubriques : éléments morphologiques à la base de la différenciation morphologique, mécanisme de l'action du milieu, nature physiologique des processus morphologiques étudiés.

PREMIERE PARTIE.-

Nous y décrivons, d'abord, le développement de colonies de levures par rapport à la surface de milieux de culture solides, ce qui semble être une manière nouvelle d'étudier et de classer leur aspect macroscopique. Nous mettons en évidence les faits suivants :

- certaines colonies ont une taille limite (SACCHAROMYCES, etc...,) d'autres ont une tendance extensive (CANDIDA HUMICOLA, etc....,)
- le développement peut se faire soit nettement au dessus de la surface du milieu sous forme de colonie typique hémisphérique, de colonie épaisse ou membraneuse, soit vers la profondeur avec un thalle profond filamenteux et rayonnant.
- il y a des variations spontanées fréquentes de la taille, de la pigmentation, de la surface (secteurs), des contours qui correspondraient au développement de lignées distinctes.

Certaines levures forment une colonie aérienne ou voile à la surface de

milieux liquides : le développement se fait de la profondeur vers la surface comme s'il y avait migration vers elle des cellules; nous montrons également qu'un voile constitué peut s'immerger secondairement et ce phénomène est comparable à l'extension en profondeur de milieux solides; enfin, certains voiles indéfiniment persistants nous paraissent être produits par des individus appartenant à une lignée distincte.

Nous étudions de la même manière des champignons filamenteux qui sont le plus souvent des Adéloromycètes. L'aspect macroscopique est très voisin sur milieux solides et sur milieux liquides; nous décrivons leur développement par rapport à la surface des premiers : il peut se faire en hauteur, en épaisseur, en surface, en profondeur (thalles glabres et immergés), nous insistons sur le cas de thalles levuriformes et sur le cas de champignons polymorphes dont *PULLULARIA PULLULANS*, une Dématiée, est un cas typique.

Après cette étude macroscopique, nous examinons le développement microscopique des levures, puis de champignons filamenteux.

Chez les levures, nous avons pu dissocier les processus de multiplication cellulaire et d'extension. Déjà, en examinant les premiers, nous avons pu faire les remarques suivantes :

- le bourgeonnement est orienté.

- la scissiparité est le fait de champignons qui ne sont plus, en réalité, des levures, mais des champignons filamenteux ayant aussi une "croissance intercalaire" éventualité niée jusqu'ici chez les champignons.

Le processus d'extension comprend "l'élongation cellulaire" et "la progression centrifuge du cytoplasme"; celle-ci consiste, comme chez les champignons filamenteux où son existence a été établie par BULLER (1933), en un déplacement centrifuge du cytoplasme au cours duquel il ^{paraît} quitter les parties les plus anciennes du thalle pour s'accumuler dans sa périphérie qui est sa zone de croissance et d'extension; ainsi, la croissance est terminale chez les levures comme elle l'est chez les champignons filamenteux (REINHARDT 1892). L'élongation cellulaire consiste dans un allongement membranaire sans modification du calibre de la cellule et elle s'observe nettement chez diverses levures se multipliant par bourgeonnement, notamment chez des *CANDIDA*; l'élongation diminuant la densité du cytoplasme fait ressortir ses courants et sa progression centrifuge qui se dégage de l'ensemble de ces courants. L'extension se traduit finalement par le développement d'un appareil pseudo-rycélien qui donne cette apparence filamenteuse rayonnante aux thalles profonds ou "immergés". Tout se passe donc comme si les cellules les plus âgées

se vidaient de leur cytoplasme au profit des cellules jeunes et distales; ceci est parfois précoce et rapide : levures à tendance extensive, ou, au contraire, tardif et lent : levures dont la colonie présente une taille limite. De toute façon, on ne peut rapporter cette disparition presque complète du cytoplasme des cellules les plus âgées uniquement à une dégénérescence locale puisque le cytoplasme résiduel, bien vivant, peut devenir le siège de processus de conjugaison, d'ascosporulation et même de chlamydosporulation; nous avons montré les rapports de ces processus avec la progression centrifuge du cytoplasme, notamment chez un certain nombre de levures haploïdes : *SACCHAROMYCES ACIDIFACIENS*, *PICHLIA FARINOSA* et *ASCOFILAMENTOSA*, *HANSENUA ELLIPSOIDOSPORA*. Ainsi, la progression centrifuge du cytoplasme apparaît déjà chez les levures comme un élément de base pour leur différenciation morphologique; elle est mise en évidence facilement de façon directe quand il y a en même temps élongation cellulaire, elle se manifeste indirectement par les transformations du cytoplasme résiduel.

Nous avons étudié, de même façon, différents champignons filamenteux, et, plus spécialement, l'extension mycélienne (allongement des membranes, progression centrifuge du cytoplasme, formation de cloisons). La progression centrifuge du cytoplasme se manifeste non seulement dans l'extension mycélienne en surface et même en profondeur (thalles immergés), mais dans la formation de spores aériennes ou le développement d'un appareil conidien; son orientation est donc variable par rapport à la surface des milieux de culture. Nous situons ce processus dans le cadre des courants cytoplasmiques et nous observons que les courants anastomotiques se présentent toujours en amont de la zone d'extension périphérique. De plus, le cytoplasme résiduel peut être à l'origine de la formation de spores de conservation. Ainsi, comme pour les levures, la progression centrifuge du cytoplasme est mise en évidence par l'observation directe et, indirectement, par celle des processus cytoplasmiques qui lui font suite. Son rôle dans la différenciation morphologique est évident et sa connaissance nous guide dans l'étude de la formation de thalles levuriformes, de thalles immergés, de la constitution d'états morphologiques convergents, de la formation d'états distincts chez des champignons polymorphes.

DEUXIEME PARTIE.-

Les modifications des propriétés physiques et chimiques des milieux peuvent entraîner des changements morphologiques et même la création d'états morphologiques distincts chez les champignons les plus polymorphes. Nous essayons de

systématiser l'influence de différents facteurs extérieurs d'après leur action sur la forme : aération, nature de l'aliment ternaire, nature et concentration de la source d'azote.

Nous avons examiné d'abord l'influence de l'aération, soit, très restreinte, soit habituelle, et nous avons fait les constatations suivantes :

- des traces d'air peuvent déclencher la formation de voile que nous considérons comme une manifestation équivalente à la progression centrifuge du cytoplasme; nous observons ceci, non seulement chez des levures douces de pouvoir fermentatif, mais chez des levures azymatiques.

- certains organismes, surtout parmi ces levures azymatiques, sont peu exigeants et peu sensibles au point de vue aération; leur forme ne se modifie guère (*GEOTRICHUM CANDIDUM*) ou ils sont très précocément et facilement différenciés (*CANDIDA HUMICOLA*); ils forment des colonies extensives et présentent spontanément une tendance au développement immergé.

- d'autres champignons tels que *HANSENULA ELLIPSOIDOSPORA* et *PULLULARIA PULLULANS* se différencient avec une aération croissante, *HANSENULA* depuis l'état blastosporé pur jusqu'à l'état filamenteux, *PULLULARIA PULLULANS* depuis l'état chlamydo-spores jusqu'à l'état *DEMATIUM* avec d'autres évolutions possibles (états levuriformes, arthrospore, mycélien pur).

- certains champignons filamenteux présentent, en cas d'aérobiose restreinte, un état levuriforme pur ("levures noires"), (conidies-levures" de *SPOROPHORA TORULIFORMIS*, etc...,) qui peut se maintenir un certain temps lorsque le champignon est replacé dans des conditions d'aération habituelle; ceci montre le rôle de l'adaptation physiologique dans la morphogénèse en relation avec la plasticité de ces organismes.

En considérant les cas extrêmes : déclenchement de la croissance par des traces d'air et différenciation morphologique avec une meilleure aération, tout se passe, selon nous, ainsi :

- l'oxygène déclenche les courants cytoplasmiques.

- une meilleure aération augmente les courants cytoplasmiques et, notamment, la progression centrifuge du cytoplasme jusqu'à une valeur limite de l'aération variable suivant les espèces.

Ajoutons que, dans les conditions de culture habituelles, l'aération est indispensable pour la production de pigments par les champignons, qu'il s'agisse de pigments caroténoïdes, mélaniques ou autres, de pigments fixes ou diffusibles.

La nature de l'aliment ternaire influence aussi fortement la morphogénèse et nous constatons que les substances infermentescibles (du point de vue de la fermentation alcoolique par les levures), c'est à dire l'alcool, le glycérol, les acides citrique, lactique, etc....., exercent sur la morphogénèse une action comparable à celle d'une forte aération; nous avons remarqué aussi qu'effectivement la croissance, avec un tel aliment ternaire, exige une plus forte aération; les acides organiques précités favorisent hautement la production de voile.

Les substances azotées ont, suivant leur nature, une influence très différente sur la morphogénèse ainsi que sur la pigmentation; certains acides aminés (tyrosine, leucine) favorisent la progression centrifuge du cytoplasme, la production de voile et l'élongation cellulaire comme le ferait une meilleure aération; d'autres ont une action inverse (glycocolle et surtout cystéine); le glycocolle peut donner une bonne croissance, mais sans favoriser la progression centrifuge du cytoplasme, la production de voile et l'élongation cellulaire. Nous notons, par ailleurs, les différences dans la capacité d'utiliser une substance azotée ou une autre suivant les organismes.

Avec l'azote nitrique, nous avons fait une constatation particulièrement intéressante : cette substance agit sur la morphogénèse et la pigmentation comme le ferait une meilleure aération alors qu'il n'en est pas de même avec l'ammoniaque, d'ailleurs plus ou moins facilement utilisable sous la forme de sulfate d'ammoniaque. Nous remarquons, en outre, que des champignons vivant en aérobiose très restreinte utilisent difficilement l'azote nitrique; il y a manifestement une adaptation à l'utilisation de l'azote nitrique.

La restriction en azote du milieu de culture freine la croissance, mais favorise le développement extensif du champignon surtout vers la profondeur du milieu; nous remarquons, en même temps, ce fait important que les thalles immergés, soustraits à l'action de l'air, ont cependant des caractères de thalle développé en surface. La restriction en azote accentue la progression centrifuge du cytoplasme et diverses manifestations qui s'y rattachent sauf la production de voile et le développement d'un appareil sporifère aérien qui fait complètement défaut. Donc la restriction en azote du milieu :

- agit dans le même sens qu'une meilleure aération et il semble qu'il y ait une relation dans l'action de ces deux facteurs.
- nous permet de distinguer la progression centrifuge du cytoplasme de la croissance vraie.

- nous montre une modification de l'orientation de cette progression centrifuge comme si le cytoplasma devait se soustraire à l'action de l'air.

TROISIEME PARTIE.-

Dans la troisième partie de notre exposé, nous avons rassemblé un certain nombre d'indications quantitatives sur les variations métaboliques obtenues sous l'influence de modifications de l'aération de la nature et de la concentration de la source azotée dont nous avons examiné l'influence sur le développement et la différenciation morphologique. Nous avons choisi des champignons qui se prêtent bien à des cultures sur milieux synthétiques; les uns paraissent peu exigeants et peu sensibles au point de vue aération : *GEOTRICHUM CANDIDUM* et *CANDIDA HUMICOLA*, d'autres sont, au contraire, sensibles et exigeants à ce point de vue : *HANSENULA ELLIPSOIDOSPORA* et *PULLULARIA PULLULANS*.

Nous exposons, d'abord, les techniques employées en insistant sur la partie bactériologique.

L'influence de l'aération est étudiée en la faisant varier soit par agitation ou non, soit par changement du rapport surface/volume et de l'espace aérien libre. Nous confirmons ce qui a été trouvé qualitativement à propos d'organismes exigeants au point de vue aération et non. Ainsi *GEOTRICHUM CANDIDUM* et *CANDIDA HUMICOLA* donnent les mêmes récoltes que le milieu soit plus fortement aéré ou non; la quantité de glucose consommée et la teneur en azote ne sont guère modifiées. *PULLULARIA PULLULANS* est, au contraire, exigeant et sensible au point de vue aération : la récolte augmente avec une meilleure aération, le rapport glucose consommé/poids sec et la teneur en azote diminuent; parallèlement, il y a une tendance extensive accrue avec accentuation de la progression centrifuge du cytoplasme. Cette influence de l'aération se démontre encore autrement : l'entraînement en aérobiose restreinte influence la morphogénèse : avec *PULLULARIA PULLULANS*, une forme chlamydosporée de profondeur présente une croissance inférieure et moins économique que la forme de surface *DEMATIUM* cultivée dans les mêmes conditions; avec *CANDIDA HUMICOLA* l'entraînement en profondeur fait que cette nouvelle forme a une meilleure croissance que la forme habituelle quand le rapport S/V est réduit. Ainsi on voit l'importance des phénomènes d'adaptation dans les réactions métaboliques dépendant de l'aération.

Nous avons étudié l'influence de la nature de la source azotée en employant d'abord des milieux à concentration élevée et croissante en peptone. Avec *CANDIDA*

HUMICOLA, la récolte augmente avec cette concentration, les teneurs en azote total et en phosphore total sont extrêmement élevées. Avec PULLULARIA PULLULANS, la récolte n'augmente pas, le rapport glucose consommé/poids sec est relativement élevé bien que la peptone soit aussi un aliment ternaire; les teneurs en azote total et en phosphore total sont d'un tiers moins élevées que pour CANDIDA HUMICOLA, organisme protéolytique. Nous étendons la comparaison de ces deux champignons avec d'autres sources azotées ammoniacale et aminées : sulfate d'ammonium, leucine, méthionine, glycocolle; chez CANDIDA HUMICOLA et chez PULLULARIA PULLULANS, entraînés préalablement sur milieu glucosé sans azote, les réactions sont très différentes. Avec le premier champignon les récoltes sont beaucoup plus fortes, variables suivant la source azotée, le rapport glucose consommé/poids sec diminue avec la valeur des récoltes, tout en tenant compte du fait que les acides aminés sont des aliments ternaires en même temps qu'une source d'azote. Avec PULLULARIA PULLULANS le rapport glucose consommé/poids sec est élevé et indépendant de la valeur des récoltes. Chez CANDIDA HUMICOLA, la leucine favorise hautement la production de voile, le glycocolle donne l'elongation cellulaire la moins forte et nous trouvons l'azote en p. 100 du poids sec le plus élevé. Il y a correspondance en présence de glycocolle entre l'élévation de la teneur en azote total et la diminution de l'elongation cellulaire qu'accompagne obligatoirement celle de la progression centrifuge du cytoplasme; ceci se retrouve chez bien d'autres champignons à la condition que le glycocolle convienne comme source unique d'azote, ce qui n'est pas le cas pour PULLULARIA PULLULANS. Toutes ces investigations montrent l'influence propre considérable sur la croissance et le comportement physiologique, du restant de la molécule d'acide aminé en dehors du groupe fonctionnel aminé.

Nous avons étudié plus à fond l'influence du nitrate de sodium qui a l'avantage d'être :

- une source azotée simple
- une source azotée minérale mieux supportée que le sulfate d'ammonium qui acidifie fortement le milieu tandis qu'avec le nitrate de sodium nous n'obtenons pratiquement pas d'alcalinisation de nos milieux.

Par contre, le nombre d'organismes vraiment nitratophiles et capables de se développer sur milieux synthétiques, parmi les levures et les champignons filamenteux autres que des aspergillacées et des hypocréales, est très limité; nous utilisons PULLULARIA PULLULANS et HANSENULA ELLIPSOIDOSPORA et nous résumons ainsi nos observations :

- la fermentation est nulle, suivant le procédé de GUERRA, avec les levures nitratophiles.

- chez *HANSENULA ELLIPSOIDOSPORA*, l'utilisation du nitrate de sodium augmente avec l'aération et la récolte est beaucoup plus faible qu'avec toute autre source azotée en atmosphère confinée.

- il y a adaptation à l'utilisation de l'azote nitrique et les organismes entraînés en faible aération poussent mal sur nitrate de sodium; leur comportement morphologique et physiologique est alors analogue à celui que nous trouvons lors de la restriction en azote du milieu de culture.

- la production en alcool en p. 100 du poids sec est bien moindre chez *HANSENULA*, en présence de nitrate de sodium que de nitrate d'ammonium.

- Avec *PULLULARIA PULLULANS*, pour une même récolte et toutes autres conditions étant égales, le rapport glucose consommé/poids sec est beaucoup plus élevé qu'avec toute autre source azotée et ceci est d'autant plus étonnant que ce champignon, azymatique, présente un rapport glucose consommé/poids sec déjà très élevé avec ces autres sources azotées.

- nous n'observons pas, du moins pour la durée de nos cultures, d'alcalinisation de nos milieux et le pH final peu changé se maintient franchement dans la zone acide du fait de la production de gaz carbonique et d'acides organiques.

Ces résultats sont à rapprocher de ceux obtenus par TERROINE et WURMSER (1922), JACQUOT (1938) chez *ASPERGILLUS NIGER*; il est évident qu'une consommation supplémentaire de glucose s'impose pour fournir l'énergie exigée par la réduction de l'azote nitrique utilisé, mais la consommation de glucose dépasse celle nécessaire à cet effet : JACQUOT en avait fourni, pour *ASPERGILLUS NIGER*, une explication dans la production d'acides organiques et notamment d'acide oxalique, comme une réaction à l'alcalinisation du milieu. Cette explication ne saurait être suffisante dans le cas de nos recherches bien qu'il y ait production aussi d'acides organiques; manifestement, l'azote nitrique sensibilise le champignon à l'action de l'oxygène et l'insuffisance d'aération limite plus rapidement la croissance qu'en présence de toute autre source azotée (cas de *HANSENULA*); il y a aussi ce fait de différence d'adaptation à l'utilisation de l'azote nitrique en fonction des conditions de vie aérobie antérieure (cas notamment de *PULLULARIA PULLULANS*); nous constatons d'ailleurs, sur le plan morphologique, que la production de voile, la progression centrifuge du cytoplasme et l'élongation cellulaire sont accentuées par l'azote nitrique comme par une aération plus

forte, que finalement la différenciation morphologique en présence de nitrate de sodium s'opère comme sous une aération plus forte. Cet ensemble d'observations nous conduit à penser que la réduction de l'azote nitrique, augmentant la consommation de glucose, augmente celle de l'oxygène ^{/qui stimule} par récurrence la respiration cellulaire, puis la consommation d'oxygène, et enfin celle de glucose. Nous interprétons ainsi, sur la base des arguments expérimentaux nouveaux que nous avons apportés, l'action de l'azote nitrique : il a donc une influence propre sur le métabolisme du glucose en stimulant sa consommation aérobie.

Un autre facteur qui influence considérablement la morphogénèse et qui est susceptible de modifier considérablement le métabolisme, c'est la restriction en azote du milieu de culture; bien que son action biochimique ait été très étudiée, notamment chez "ENDOMYCES VERNALIS" et chez ASPERGILLUS NIGER (RAAF, RAVEUX et alii), la signification physiologique de cette action a échappé en raison de la méconnaissance des réactions morphologiques si importantes qu'elle provoque. La restriction en azote limite évidemment de son fait la protéogénèse, mais elle accentue, comme nous l'avons dit, la progression centrifuge du cytoplasme et provoque l'immersion comme si le champignon devait se soustraire à l'action de l'oxygène; nous venons de dire également qu'elle s'opposait à la production de spores et au développement d'un appareil sporifère aérien.

L'action morphologique similaire de la restriction en azote et d'une forte aération en ce qui concerne la progression centrifuge du cytoplasme nous a fait penser que :

- la restriction en azote sensibilisait le champignon à l'oxygène.
- les réactions métaboliques, sous son influence, devaient être d'autant plus importantes que les champignons étaient plus aérobies; c'est ce que nous avons vérifié avec GEOTRICIUM CANDIDUM, CANDIDA HUMICOLA, PICHIA ASCOFILAMENTOSA, PHANSENULA ELLIPSOIDOSPORA, PULLULARIA PULLULANS. L'importance des réactions métaboliques va en croissant avec celle des réactions morphologiques dans l'ordre indiqué; il y a diminution de la teneur en azote qui va de pair avec l'accentuation de l'élongation cellulaire et de la progression centrifuge du cytoplasme, il y a élévation du taux de consommation de glucose, la lipogénèse et la pigmentogénèse sont accrues. Ces différentes constatations nous font penser que la restriction en azote stimule la respiration cellulaire.

Ainsi, une plus forte aération, l'emploi du nitrate de sodium, la restriction en azote du milieu accentuent la progression centrifuge du cytoplasme et ont une action convergente sur la morphogénèse, en remarquant toutefois, en ce qui concer-

-ne la restriction en azote, que celle-ci freine la production de voile et le développement d'un appareil sporifère. Tous trois, cependant, modifient de façon différente le taux de consommation de glucose : une meilleure aération l'abaisse, le nitrate de sodium et la restriction en azote l'élèvent; le nitrate de sodium probablement par le mécanisme que nous supposons, la restriction en azote parce que l'organisme freiné dans sa croissance, mais demeuré vivant, continue d'utiliser le glucose. Tous trois abaissent de façon plus ou moins importante la teneur en azote. Ces variations sont d'autant plus prononcées que les champignons sont plus plastiques; donc, de même qu'ils sont plastiques, leur métabolisme est adaptatif.

QUATRIEME PARTIE.-

Les recherches précédentes nous ont montré :

- des relations entre la morphogénèse, des variations de forme parfois considérables liées à la plasticité et le métabolisme, surtout le métabolisme glucidique, qui semble être adaptatif.
- une certaine convergence d'action du facteur aération et du facteur azoté; ceci nous a fait nous demander si l'oxygène n'agit pas, en réalité, sur le métabolisme glucidique par l'intermédiaire du facteur azoté puisque, à travers l'action du facteur azoté, nous retrouvons toujours celle de l'oxygène.

Pour vérifier cette hypothèse, nous cultivons les champignons les plus exigeants en oxygène sur un milieu dont la source azotée est le nitrate de sodium qui les sensibilise davantage à son action et nous observons si des traces de substances ayant une action bio-chimique connue ne modifiaient pas l'utilisation du nitrate de sodium en même temps que la consommation de glucose et, bien entendu, la croissance; nous avons choisi la cystéine parce que, théoriquement, elle pourrait abaisser le niveau des oxydo-réductions cellulaires, l'ammoniaque parce qu'il est un produit du métabolisme de l'azote nitrique, l'aneurine parce qu'elle favorise la fermentation alcoolique, le fluorure de sodium et l'acide malonique parce qu'ils sont des inhibiteurs enzymatiques, l'un complexe pour le métabolisme du glucose, l'autre de la succino-déshydrase, certains acides organiques, enfin, parce qu'ils pourraient intervenir dans un "cycle respiratoire".

La cystéine a une action généralement contraire à celle de l'azote nitrique et d'une meilleure aération en s'opposant à la production de voile, à la progression centrifuge du cytoplasme, à l'élongation cellulaire. Chez PULLULARIA PULLULANS

la cystéine, en très faible quantité ajoutée au nitrate de sodium, abaisse le taux de consommation de glucose en l'amenant à la valeur trouvée en présence d'une source ammoniacale ou aminée; ceci prouve que le taux de glucose consommé en présence de nitrate de sodium dépasse beaucoup celui qui correspondrait à un supplément de consommation requis pour fournir l'énergie exigée par la réduction de l'azote nitrique. En même temps, la cystéine améliore la croissance de la forme chlamydosporée profonde et mal adaptée à utiliser l'azote nitrique alors qu'elle diminue celle de la forme DEMATIUM superficielle et bien adaptée, qui est plus aérobie. Nous pensons que, dans le premier cas, la cystéine rend le niveau des oxydo-réductions cellulaires compatible avec l'utilisation de l'azote nitrique.

Avec HANSENULA ELLIPSOIDOSPORA, nous avons comparé l'influence de l'azote nitrique et de l'azote ammoniacal sur le métabolisme et la composition chimique de l'organisme; or le nitrate d'ammonium est d'emblée une source azotée mixte pour cette levure et ceci nous a fait penser que l'ammoniaque, produit du métabolisme de l'azote nitrique, mais n'apparaissant qu'exceptionnellement dans les milieux de culture, pouvait, à l'état de traces, stimuler la réduction biologique de l'azote nitrique; en effet la croissance est accrue dans des proportions telles que la faible quantité d'azote ammoniacal ajoutée ne peut vraiment servir d'aliment azoté et il y a amélioration de l'utilisation de l'azote nitrique dans ces conditions de faible aération qui, sur les témoins, limitent cette utilisation. Nous ne constatons pas de faits similaires avec PULLULARIA PULLULANS qui utilise l'azote ammoniacal, puis l'azote nitrique; il semble que l'ammoniaque influence le niveau des oxydo-réductions cellulaires chez cette levure haute en agissant sur son métabolisme intermédiaire.

Avec ce même HANSENULA, l'adjonction d'aneurine à un milieu nitrate de sodium-glucose diminue fortement la croissance, élève considérablement le taux de consommation de glucose et la production d'alcool en p. 100 du poids sec, restreint la lipogénèse, freine l'utilisation de l'azote nitrique en même temps qu'elle fait augmenter la teneur en azote du champignon. Sur le plan morphologique, elle restreint considérablement la production de voile, la progression centrifuge du cytoplasme, l'élongation cellulaire, empêche la formation d'asques. Ces effets sont à peine diminués par une plus forte aération. L'action de l'aneurine, en l'occurrence, est donc bien antagoniste de celle de l'azote nitrique et de celle d'une meilleure aération; ceci renforce l'interprétation que nous avons proposée du mécanisme de l'action de l'azote nitrique sur le métabolisme et sur la morphogénèse.

Chez cette même levure, le fluorure de sodium, substance toxique, a une action trop complexe, en milieu de culture, pour pouvoir l'interpréter; l'addition d'aneurine en plus fait voir une action intriquée de ces deux substances dont l'effet sur le taux de consommation de glucose se contrarie; en présence d'acide malonique ajouté à l'état de traces, le fluorure de sodium est complètement inhibiteur; il est probable que, comme d'autres substances toxiques, le fluorure de sodium crée des mutants ou provoque une sélection de lignée résistante.

L'acide malonique a un effet tout à fait différent de celui attendu en tant qu'inhibiteur de la succino-déshydrase in vitro (QUASTEL et WOOLDRIDGE). Il stimule considérablement la croissance; il s'agit là d'une action initiale se produisant dès que le voile est ébauché; il favorise hautement la réduction biologique de l'azote nitrique et fait diminuer la teneur en azote du champignon. Sur le plan morphologique, il accuse l'effet propre de l'azote nitrique en accentuant encore la production de voile et la progression centrifuge du cytoplasme, l'élongation cellulaire, la production plus tardive d'asques.

Tout se passe comme si cette culture en présence de nitrate de sodium était plus aérée; parallèlement, le taux de consommation de glucose est abaissé et il y a diminution de la production d'alcool en p. 100 du poids sec; ceci est d'autant plus remarquable que ces observations sont faites dans des conditions de faible aération qui freine, sur les témoins, l'utilisation de l'azote nitrique; d'ailleurs proportionnellement l'action de l'acide malonique est plus forte en présence de nitrate de sodium quand l'aération est réduite.

Cette action si importante de traces d'acide malonique, nous la retrouvons avec d'autres acides organiques qui, selon les conceptions de WIELAND, interviendraient dans un cycle respiratoire (KREBS); d'ailleurs, l'acide malonique a été considéré comme un intermédiaire dans la formation d'acides organiques, chez *ASPERGILLUS NIGER*, par CHALLANGER, SUBRANAMIAN et WALKER. Nous avons trouvé dans la littérature une action stimulante de ces acides organiques, autres que l'acide malonique, sur la croissance de *Mucoracées* en présence d'une source azotée ammoniacale (LEONIAN et LILLY).

Qu'il s'agisse de cystéine, d'aneurine, de fluorure de sodium, d'acide malonique, d'acides organiques autres, si on substitue l'azote ammoniacal à l'azote nitrique comme source d'azote, leur action peut être très différente dans sa nature ou son intensité; ceci contribue à opposer les deux grandes sources azotées minérales dans leur influence sur le métabolisme glucidique, sur la composition

chimique ainsi que sur la morphogénèse.

Ces résultats confirment les relations trouvées, dans la troisième partie, entre la morphogénèse et le métabolisme.

DISCUSSION.-

Dans la discussion, nous considérons les résultats obtenus dans leur ensemble.

Nous examinons d'abord les processus morphologiques à la base de la différenciation morphologique des champignons que nous avons étudiée et nous constatons, d'après l'analyse de nos résultats, que la progression centrifuge du cytoplasme joue un rôle particulièrement important.

Nous étudions ensuite le mécanisme de l'action du milieu sur la forme dont il provoque des modifications réversibles, les seules, d'ailleurs, que nous prenions en considération. Le milieu agit directement sur la matière vivante, car il n'y a pas chez les champignons de milieu intérieur, ni de système ^{différencié} méristématique orientant la croissance. Nous résumons les caractères propres à l'action de chaque facteur : aération, emploi d'azote nitrique, etc..., Nous les comparons et, finalement, comme ces organismes sont plastiques avec des capacités d'adaptation physiologique très étendues, nous trouvons que le milieu agit en même temps sur la morphogénèse et sur le métabolisme intermédiaire qui est adaptatif.

Finalement, nous reconnaissons la nature physiologique de la progression centrifuge du cytoplasme : c'est un processus relativement indépendant de la croissance dont nous pouvons le dissocier, qui a un siège périphérique distal, qui a une direction centrifuge, dont le sens est variable soit vers l'air, dans le cas de développement d'un appareil sporifère, soit vers la profondeur, dans le cas de thalles immergés; il peut être provoqué par des traces d'air et augmente avec l'aération jusqu'à une certaine valeur de celle-ci variable suivant les organismes; son intensité est influencée par les facteurs qui sensibilisent le champignon à l'action de l'oxygène. De tels caractères sont ceux d'un tropisme et nous considérons la progression centrifuge du cytoplasme comme un oxytropisme, généralement positif, mais qui peut devenir négatif (thalles immergés). Ainsi on comprend comment l'oxygène peut influencer si profondément la morphogénèse des champignons étudiés.

BIBLIOGRAPHIE. (Ouvrages consultés).

- AGID R., Recherches sur les régulations métaboliques. Effets de l'insuline sur les réactions des tissus du lapin au cholestérol, au jeûne et aux saignées. Thèse, Paris, 1953.
- AUBEL E., Les fermentations, P.U.F. N° 524
- AUBEL E., Sur la désamination de l'alanine. C.R. Soc. biol. II3, 1933, 37.
- AUBEL E., Au sujet du rôle des nitrates dans les oxydations biologiques, Enzymologia 4, 1937, 51.
- AUBEL E. et HOUGET J., Consommation d'oxygène par un anaérobie strict, CLOSTRIDIUM BUTYRICUM, C.R. 209, 1939, 259.
- BAIL Th., Über Hefe. Flora 1857, 417-29, 433-43.
- BAKER J.R., Cytological technique, Methuen & Co.
- BARJAC H. de, Réduction des sulfates et des nitrates en anaérobiose; incidences sur le cycle du fer. 8ème congrès int. bot. 1954, sec 2I, p 15.
- BARRON E.S.G., The tricarboxylic acid cycles. Alternative pathways. 2ème congrès int. bioch. 1952, 91-107.
- BEDFORD C.L., A taxonomic study of the genus HANSENULA, Mycologia 34, 1942, 628.
- BERAUD P., Influence de la nutrition azotée sur le pouvoir respiratoire et le pouvoir fermentatif d'une levure de boulangerie, C.R. Soc. biol. 131, 1939, 708.
- " , Sur le processus d'accoutumance des levures aux milieux minéraux, id 135, 1941, 683 et 872.
- " , Sur l'exaltation du développement des levures traitées au fluorure, id 137, 1943, 579.
- " , La lipogénèse dans le monde des microbes et des végétaux inférieurs, éd. Maison chimie, Paris 1942.
- " , La biologie de la levure dans ses rapports avec les diverses industries, id, 1945.
- BERKHOUT C.M., De Schimmelgесlachten MONILIA, OIDIUM, OOSPORA en TORULA. Thèse Utrecht, 1923.
- BIRKINSHAW J.H., Chemistry of the fungi, Ann. rev. of Bioch., 22, 1953, 371.
- BOIVIN A., Les deux acides nucléiques et leur rôle dans la constitution et dans la vie des cellules bactériennes. Rev. can. biol., , 1948, 368.
- BONNET H. et JACQUOT R., Variations de la vitesse de croissance, de la respiration du STERIGMATOCYSTIS NIGRA et du rendement énergétique brut en fonction de l'âge des cultures et de la source azotée, C.R. 201, 1935, 1.622
- " , Le métabolisme glucidique du STERIGMATOCYSTIS NIGRA est fonction de la source azotée du milieu de culture, C.R. 201, 1935, 1.213.
- BORY R., GUYOTJEANNIN Ch. et LUTERAAN Ph.J., Sur une mycose de la peau glabre à ALEURISMA LUGDUNENSE VUILL. 1924, Ann. Derm. et syph., 79, 1952, 661.
- BERGER L. et LANGERON M., Sur un type nouveau de chromomycose observé au CANADA (TORULA BERGERI n. sp.) Ann. parasit. 24, 1949, 574.
- BERNHAEUER K., Gärungschemisches Praktikum, Springer, Berlin 1939
- BLOOM J.C., The exhaustion of media in bacterial cultures, J. of inf. dis. 23, 1929, 109

BOULANGER P., Les réactions de conversion dans le métabolisme des acides aminés., Ann. nut. alim. 8, 1954, 647

BRAUNSTEIN A.E. et KRITZMANN M.G., I Über den Umsatz der 1(+) glutaminsäure im Muskelgewebe, II Die gleichgewichtige Reaktion zwischen 1(+) glutaminsäure, bzw 1(+) alanin und Ketoglutarinsäure. Enzymologia 2, 1937, 129 et 138.

BRIERLEY W.B., Variation in Fungi and Bacteria, Proc. int. cong. Plant sc. Ithaca 2, 1929, I.629.

BROWN H.Y., Some studies on yeast. Part I, The relation of cell reproduction to the supply of free oxygen, Ann. bot. 28, 1914, 196.

BROWN W., Physiology of the host parasit relationship in fungi and bacteria. Nature 171, 1953, 340.

BULLER A.H.R., Researches on fungi. 6 volumes : I, 1909; 2, 1922; 3, 1924; 4, 1931; 5, 1933; 6, 1934.

BUNNING E., Entwicklungs und Bewegungsphysiologie der Pflanzen. Springer-v., Berlin.

BURKHOLDER P.R. et Mc VEIGH I., PHYCOMYCES BLAKESLEANUS in relation to varied environmental conditions. Am. j. bot. 27, 1940, 634.

BURRI R. et STAUB W., MONILIA NIGRA als Ursache eines Falls vom Schwartzpfeckigkeit bei Emmenthalerkäse, Landschw. Jahrb. der Schweiz 23, 1909, 487-522.

BUTTER E.J., The delimitation of species of fungi on physiological grounds, Proc. int. cong. Plant sc. Ithaca 2, 1929, I.590.

CAHN Th., Dégénérescence musculaire, Ann. physiol. I, 1927, 4.

CAHN Th. et BONOT A., Variations des équilibres des constituants cellulaires.

Exposés critiques et analytiques des méthodes biochimiques, Ann. physiol. 4, 1928, 821

CAHN Th., HOUGET J., Etude du métabolisme dans le diabète expérimental. Ann. physiol. 14, 1938, 734.

CAHN Th., HOUGET J. et AGID R., Sur les phospholipides des tissus animaux, Bull. Soc. ch. biol., 31, 1949, 766

CALANDRON A., Conjugaison et multiconjugaison du mycélium de champignons levuriformes à pigment noir, C.R., 237, 1953, 91.

" , Etude bibliographique des champignons levuriformes à pigment noir. Ann. éc. nat. agr. Rennes 15, 1953-4, 77.

" , Contribution à l'étude physiologique de deux champignons levuriformes fuligineux, TORULA DEMATIA BERK. et PULLULARIA PULLULANS BERK., id 15, 1953-4, 101

CANTARELLI C., Sul chimismo fermentativo del genere HAMSENULA SYDOW, Boll. Soc. it. biol. sp. 26, 1950, 202.

CANTINO E.C., The role of metabolism and ketoglutarate oxidase in the growth and differentiation of the aquatic Phycomycete BLASTOCLADIELLA EMERSONI, Trans. N.Y. Ac. sc. 15, 1953, 159

CARLO F.J. di, SCHULTZ A.S. et FISHER R.A., Yeast nucleic acid, III Effect of glycine on proliferation and nucleic acid biosynthesis, Arc. bioc. 27, 1950, 29

CAULLERY M., Les conceptions modernes de l'hérédité, Flammarion 1947

" , Génétique et hérédité, P.U.F. N°113.

CHADEFAUD M., Biologie des champignons. Gallimard N°19.

CHALIENGER F., SUBRAMANIAM M. K. et WALKER T.K., The mechanism of the formation of citric and oxalic acids from sugars by ASPERGILLUS NIGER J. chem. Soc. I30 1927, 3000

CHEVILLARD L., HAMON F., MAYER A. et PLANTEFOL L., Action de l'oxygène libre sur la respiration des tissus végétaux aériens, III Ann. physiol. 6, 1930, 549

CHANCE B. et SMITH L., Biological oxidations, Ann. rev. bioch. 21, 1952, 687.

CHANTRENNE H., Formation induite de cytochrome-peroxydase chez la levure, Bioch. bioph. acta 14, 1954, 157.

CHUNG C.W. et NICKERSON W.J., Polysaccharides syntheses in growing yeasts. J. biol. chem., 208, 1954, 395.

CLIFTON C.E., Oxidative assimilation by various microorganisms, Ant. van LEEUW. 12, 1947, 186.

COCHET G., Recherches sur la flore mycologique de l'intestin des rongeurs, Thèse Paris, 1940.

COLIN H., La chimie des plantes, Flammarion 1945.

COLIN H., BELVAL H. et LEGRAND G., Les ferments d'oxydation, Hermann et Cie, Paris, N° I.034.

COMANDON J. et FONBRUNE P. de, Recherches expérimentales sur les champignons prédateurs des Nématodes du sol. C.R. Soc. biol. 129, 1938, 619 - 620 - 623.

COMBES R., La vie de la cellule végétale. A. Colin N° 96 - 109 - 203.

" , La forme des végétaux et le milieu. A. Colin N° 240.

" , La physiologie végétale, P.U.F. N° 287.

COMANT N.F., MARTIN D.S., SMITH D.T., BAKER R.D. et CALLAWAY J.L., Manual of clinical mycology, Saunders, Philad. 1944.

COURTOIS J., Les facteurs de croissance de la levure, éd. Maison chimie, Paris 1942

CRUESS W.J. et POGDORNY A., Destruction of volatile acidity of wine by film yeasts. The fruit products j. USA 17, 1937, 4-5

CRUESS W.J., WEAST C. et GILLILAND R., Summary on practical investigation on film yeasts. Id 17, 1937, 229 et 251.

CUSTERS M. Th. J., Onderzoekingen over het gistgeslacht BRETTANOMYCES, Thèse Delft 1940.

COMBES R. et GERTRUDE M. Th., Contribution à l'étude des possibilités biochimiques d'une espèce végétale, C.R. 208, 1939, 1.107

DARLING S.T., A protozoan infection producing pseudotubercles in the lungs and focal necrosis in the liver, spleen and lymph nodes. J. am. med. ass. 46, 1906, 1.283

" , Histoplasmosis, a fatal infections disease resembling kala-azar found among the nature of tropical AMERICA, Arch. int. med. 2, 1908, 107.

DAVIES R., Enzyme formation in SACCHAROMYCES FRAGILIS I Invertase and raffinase. Bioch. J. 55, 1953, 484.

DAVIES R., FALKINER E.A., WILKINSON J.F. et PEEL J.L., Ester formation by yeast. Bioch. J. 49, 1951, 58

DAVIS E.A., Nitrate reduction by CHLORELLA, Plant physiol. 28, 1953, 539.

De BARY , Beiträge zur Morphologie und Physiologie der Pilze, Franefort 1881

- DELANETER E.D., The Nuclear cytology of the vegetative diplophase of SACCHAROMYCES CREVISIAE. J. bact. 60, 1950, 321
- DELAPORTE B., Observations on the cytology of bacteria, Adv. in genetics 3, 1950, 1
- De MONBREUN W.A., The cultivation and cultural characteristics of DARLING'S HISTOPLASMA CAPSULATUM, Am. J trop. dis. 14, 1934, 93
- DEYSSON G., Le cytoplasme de la cellule végétale, Bull. Soc. bot. 102, 1955, 44
- DRECHSLER Ch., Some hyphomycetes that prey on free-living terricolous nematodes. Mycologia, 29, 1937, 467.
- DUBOS R.J., The bacterial cell, Harvard univ. press, 1945
- DUFRENOY J., Un important chapitre de la pathologie comparée : l'antagonisme entre amino-acides. Rev. path. comp. et hyg. gén. 49, 1949, 279
- " , Les méthodes auxanographiques et leur application au dosage des antibiotiques. Ann. parasit. 22, 1949, 449.
- FAGUET M., La technique des enregistrements continus des courbes de croissance microbienne. Biol. méd. 42, 1953, 27
- FARRER K.T.H., Observations on the pH of the yeast cells. Aust. j. exp. biol. med. sc., 31, 1953, 577
- FAURE H.P., La microscopie de fluorescence en lumière ordinaire, C.R. Soc. biol. 141, 1947, 1.219
- FAURE-FREMIET E., Les facteurs de la forme chez les êtres vivants. Univ. Paris, Conf. Palais découv., 9 - IX - 1949
- FERNBACH A. et SCHILLER N., Du rôle de la réaction du milieu dans la fermentation élective, C.R. 178, 1924, 2.196
- FFULGEN R. et ROSSENBECK H., Mikroskopisch chemischer Nachweis einer Nucleinsäure von Typus der Thymonucleinsäure und die darauf beruhende elektive Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten. Zts physiol. ch. 135, 1924, 203
- FINGHAM J.R.S. et BOULTER A.B., Effects of amino-acids on the production of transaminases by NEUROSPORA CRASSA, J. gen. microb. 13, 1955, N°1, 5-6
- FITZPATRICK H.M., The lower fungi, Phycomycetes, Mc Graw-Hill, N.Y. 1930
- FLEURY P. et COURTOIS J., Les diastases, A. Colin, Paris.
- FOSTER J.W., Chemical activities of fungi, Ac. Prss N.Y. 1949
- " , Mc DANIEL L.E., WOODRUFF H.B. et STOKES J.L., Microbiological aspects of PENICILLIUM, J. Bact. 50, 1945, 365
- " , DAVIS H., Detection and occurrence of acid producing fungi, Bull. of the Torrey bot. club, 76, 1949, 174
- FONTAINE M. et RAFFY A., Dosage de la flavine au cours du développement de EREMOTHECIUM ASHBYI, C.R. 205, 1937, 1.005
- FROMAGEOT Cl., Le mécanisme des réactions enzymatiques, Pr. pharm. 1, 1946
- " et BOST G., Sur le pouvoir réducteur des levures vivantes, C.R. 204, 1937, 1.008
- " et TCHANG-JOUE L., Sur les pigments caroténoïdes de RHODOTORULA SANNIELI, Arc. f. Mikrob. 9, 1938, 424

- GAUMANN E., Vergleichende Morphologie der Pilze. Fischer, Iena 1926
- GAUTHERET R.J., La culture des tissus végétaux, End. 7, 1948, 75.
 " , Le cancer végétal , End. 9, 1950, 21.
- GAYET J., Influence de l'aliment azoté sur la cytochimie de la croissance chez STERIGMATOCYSTIS NIGRA. C.R. 230, 1950, 2.230
 " , Sur un aspect de la cytochimie de la croissance chez STERIGMATOCYSTIS NIGRA en milieu équilibré. C.R. 230, 1950, 1.972.
- GENEVOIS L, PEYNAUD E. et RIBEREAU-GAYON J., Sur une filiation numérique entre les divers produits secondaires de la fermentation alcoolique, Bull. Soc. ch. biol. 31, 1949, 369
 " , Action du milieu sur les produits de la fermentation alcoolique des levures elliptiques, C.R. 226, 1947, 126.
- GLAJA J. et MARKOVIC L., Sur la respiration de la levure, C.R. Soc. biol. 119, 1935, 639
- GILCHRIST T.C., A case of blastomycetic dermatitis in man, J. HOPKINS hosp.repts, 1, 1896, 269.
- GLAUBITZ M., Atlas des organismes de fermentation, Dunod, Paris 1941.
- GOUREVITCH A., Etude sur les substances à fluorescence bleue. Sur la teneur en flavine de la levure cultivée en présence de cyanure, C.R. Soc. biol. 127, 1938, 216
- GROSSER A.M. et FRIEDRICH W., Über die Bildung von 6-Methylsalicylsäure durch PANICILLIUM CLAVIFORME BAIN. Z. Naturf. 3, 1948, 380
- GUILLIERMOND A., Clef dichotomique pour la détermination des levures, Lefrançois 1928
- GUILLIERMOND A. et MANGENOT G., Biologie végétale, Masson et Cie, Paris.
- GUILLIERMOND A., MANGENOT G. et PLANTEFOL L., Traité de cytologie végétale, Lefrançois 1933.
- GUILLIERMOND A., Quelques remarques nouvelles sur la structure des levures, C.R. Soc. biol. 88, 1923, 517
- HANSMANN G.H. et SCHENKEN J.R., A unique infection in man caused by a new yeast like organism, a pathogenic member of the genus SEPEDONIUM, Am.J. Path. 10, 1934, 731
- HARDEN A., Alcoholic fermentation, Longmans Green, N.Y. 1932 4ème éd..
- HARDEN A. et YOUNG W.J., The influence of phosphates on the fermentation of glucose by yeast juice, Proc. chem. Soc. 21, 1905, 189.
- HARDWICK G.H. et FOSTER W.J., On the nature of sporogenesis in some aerobic bacteria, J. gen. physiol., 35, 1952, 907.
- HAWKER L.E., The physiology of Myxomycetes, Br. mycol. Soc. tr. 35, 1952, 177
- HEIDE S., Zur Physiologie und Cytologie der Fettbildung bei ENDOMYCES VERNALIS, Arch. f. Mikrob. 10, 1939, 135.
- HEIM R., Le genre INOCYBE, Le Chevalier, Enc. mycol. 1, 1931
 " , Les lactario-russules à anneau : ontogénie et phylogénie, Rev. mycol. 2, 1937
 " , Sur l'existence de bolets à tubes libres, C.R. 208, 1939, 375.
 " , Les pigments des champignons dans leurs rapports avec la systématique, Bull. Soc. ch. biol. 29, 1942, 48.
 " , La reproduction chez les plantes, A. Colin N°220.

- HEITZMANN P., La production des cétones par fermentation, Ed. de la maison de la chimie 1945.
- HENRICI A.T., The yeasts, Genetic, Cytology, Variation and Identification, Bact. Rev. 15, 1941, 97
- " , Characteristics of fungous diseases, J. bact. 39, 1940, 113
- HENRICI A.T., SKINNER Ch.E., EMMONS Ch.W., TSUCHIDA H.M., Molds, yeasts and Actinomycetes, J. Wiley & sons N.Y. 2ème éd. 1947.
- HENRY B.S., The viability of yeast cultures preserved under mineral oil, J. bact. 54, 1947, 264.
- HEYMANS P., Influence de quelques inhibiteurs sur l'assimilation d'azote ammoniacal par la levure de boulangerie, Bull. Soc. ch. biol. 32, 1950, 419.
- HINSHELWOOD C.N., The chemical kinetics of the bacterial cell. Univ. Press Oxford 1946
- " , Alternative reactions patterns in autotrophic systems, J. ch. Soc. 1953, I.304.
- " , Bactériologie et cinétique chimique, End 8, 1949, 151.
- HOHL L.H. et CRUESS W.V., Observations on certain film forming yeast. The fruit products j. 20, 1940, 72 et 108.
- HOOGERHEIDE J.C., Bijdrage tot de kennis van de reactie van PASTEUR, Thèse Leiden 1935
- HOUGET J., Contribution à l'étude de la composition chimique du muscle, sang et foie du chien et de la variation de ces compositions après des contractions musculaires intenses et répétées, Thèse Paris 1933
- HOUGET J., MAYER A. et PLANTEFOL L., Sur une forme particulière d'oxydation biologique. Ann. physiol. 3, 1927, 663 et 4, 1928, 123.
- HUGHES S.B., Acidic metabolic products of HANSENULA ANOMALA, Mycologia 44, 1952, 736
- ISTIN M., L'oxygène et la fermentation alcoolique. Contribution à l'étude de l'aérobiose et de l'anaérobiose, Rev. can. biol. 6, 1947, 492
- JACQUOT R., Biochimie et bioénergétique du STERIGMATOCYSTIS NIGRA, IV Le rendement énergétique dans la croissance. Ann. physiol. 13, 1937, 209
- " , La fermentation oxalique. Mécanisme de l'oxalicogénèse chez les Mucédinées, Ann. des ferm. 4, 1938, 284
- JACQUOT R. et RAVEUX R., Formation concomitante des lipides et d'alcool chez STERIGMATOCYSTIS NIGRA, C.R. 216, 1943, 318
- JACQUOT-ARMAND Y. et RAVEUX R., Influence de la concentration de l'aliment azoté sur la teneur en azote de STERIGMATOCYSTIS NIGRA, C.R. 219, 1944, 82
- JAMES W.O., The use of respiration inhibitors. Ann. rev. plant Physiol. 4, 1953, 59
- JANKE A. et SORGO F., Über die Wachstoffsstoffe der Schimmelpilze, Arc. f. Mikrob. 10, 1939, 265.
- JØRGENSEN A. et HANSEN Alb., Microorganism and fermentation, Griffin & C° 1948
- JOSLYN M.A. et DUNN R., Acid metabolism of wine yeast, J. of am. ch. Soc. 60, 1938, I.137
- KARSTRÖM H., Enzymatische Adaptation bei Mikroorganismus, Erg. f. Enzymf. 7, 1938, 350

- KEILIN D. et TISSIERES A., Haemoglobin in certain strains of yeasts. Bioch. j. 57, 1954, N°4, 29-30.
- KELSO J.M. et TURNER J.S., Protoplasmic streaming in TRIDESANTIA, Aust. j. biol. sc. 8, 1955, 19
- KITCHIN J.A. et PIZENNE M.H., The influence of low tension of oxygen on the protoplasmic streaming of Myxomycetes, J. cell. and comp. physiol. 16, 1940, 131
- KLEBS G., Die Bedingungen der Fortpflanzung bei einigen Algen und Pilzen, Fischer, Iena 1896.
- KLÖCKER A., Die Gärungs organismen, 1924
- KLUYVER A.J., Biochemische suikerbepalingen, Thèse Leiden 1914.
- " , Quelques remarques sur la classification des levures, Ann. zymol. série 2, I, 1931, 47
- " , Chemical activities of microorganisms, Univ. of London press, 1931
- " et CUSTERS M.Th.J., The suitability of disaccharides as respiration and assimilation substrates for yeasts which do not ferment these sugars, Ant. van LEEUW. 6, 1939-40, 121-162
- " et HOOGERHEIDE J.C., Beziehungen zwischen den Stoffwechsel vorgängen von Hefen und Milchsäurebakterien und den Redoxpotential im Medium. Enzymol. I, 1936, I
- " et PERQUIN L.H.C., Zur Methodik der Schimmelstoffwechseluntersuchung. Über die Bedingungen der kojisäurebildung durch ASPERGILLUS FLAVUS LINK, Bioch. Z. 266, 1933, 68, 82.
- " et VERHOEVEN W., Studies on the true dissimilatory nitrate reduction, Ant. van LEEUW. 20, 1954, 241.
- KNIEP H., Die Sexualität der niederen Pflanzen, Fischer, Iena 1928
- KÖHLER E., Beiträge zur Kenntnis der vegetativen Anastomosen der Pilze, Planta 8 1929, 140.
- KREBS H.A., The place of the tricarboxylic acid cycle in cell metabolism, 2ème congrès int. bioch. 1952, 42, Sedes Paris.
- " , The citric acid cycle, 1954, Norstedt , Stockholm.
- KUFFERATH H., Cultures de levures diverses en présence d'acides organiques en solution concentrées, Ann. zymol., série 2, I, 1931, 9.
- KUSHNER D.J. et QUASTEL J.H., Factors underlying bacterial enzyme synthesis, Proc. Soc. exp. biol. med. 82, 1953, 388
- LAIBACH F., Das Dualphänomen, Biol. Zbl 69, 1950, 209.
- LANE C.G.A., Cutaneous disease caused by a new fungus (PHIALOPHORA VERRUCOSA), J. cut. dis. 33, 1915, 840.
- LANGERON M., Précis de mycologie, Masson et Cie Paris 1944, édition originale (très importante documentation et analyse notamment des travaux de BULLER)
- " , Précis de microscopie, Masson 1949, 7ème éd. (avec le ROMEIS, ouvrage de base en microbiologie courante)
- " , Article "PIEDRA" dans la "nouvelle pratique dermatologique" 2, 1936, 377
- " et MILOCHEVITCH S., Morphologie des Dermatophytes sur milieux naturels et milieux à base de polysaccharides, Ann. paras. 8, 1930, 434 et 472.

- LANGERON M. et TALICE R.V., Nouvelles méthodes d'étude et essai de classification des champignons levuriformes, Ann. parasit. 10, 1932, 1
- LANGERON M. et GUENRA P., Nouvelles recherches de zymologie médicale, Ann. parasit. 16, 1938, 160p, 22 pl..
- " , Valeur et nature des variations et dissociation des colonies chez les champignons levuriformes, Ann. parasit. 17, 1939-40, 447.
- " , Les secteurs clairs et sombres des colonies de levures Ann. parasit. 18, 1941, 101.
- LANGERON M., LUTERAAN Ph.J., L'emploi des colorants acides en mycologie et en microbiologie générale, Ann. parasit. 22, 1947, 254-275.
- LEDERER E., Les caroténoïdes des plantes, Hermann et Cie, Paris N° 137
- LEHNAETZ E., Einführung in die chemische Physiologie, Springer, Berlin 1948, 6ème éd.
- LEMOIGNE M., Le sort de nitrates dans le métabolisme cellulaire, spécialement chez les végétaux supérieurs, Exp. an. bio. méd. 2, 1939, 225
- LEMOIGNE M., DESVEAUX R., GAVARD R., Réduction des nitrates en nitrites par les microbes du groupe BACILLUS SUBTILIS. C.R. 218, 1944, 215
- LEONIAN L.H. et LILLY V.G., Studies on the nutrition of fungi, IV Factors influencing the growth of some thiamin requiring fungi, Am. j. bot. 27, 1940, 18
- " , Factors affecting zygosporangium formation in PHYCOMYCES BLAKESLEANUS, Am. j. bot. 27, 1940, 670
- LEUNIS J., Synopsis der drei Naturreiche, 2 Botanik, III Kryptogamen, 1886
- LEY J. de, Nitrogen-deficient organisms, a new technique in microbiological chemistry, Ann. Ac. sc. fennicae, Série A 2, 1955, 37.
- LHOTELIER A., Influence de l'état hygrométrique et de l'éclaircissement sur les tiges et les feuilles des plantes à piquants, Thèse sc. 1893.
- LIENER I. E., BUCHANAN D.L., The fixation of carbon dioxide by growing and non growing yeast. J. bact. 61, 1951, 527.
- LIETZ K., Beitrag zur Hefecytologie, Arch. f. Mikrob. 16, 1951, 275.
- LILLY V.G. et LEONIAN L.H., Some factors affecting the dry weight of CHLORELLA VULGARIS, Am. j. bot. 7, 1941, 28.
- LINDNER P., Das Problem der biologische Fettbildung und Fettgewinnung, Z. angew. Ch. 35, 1922, 110.
- LIPMANN F., Metabolic generation and utilization of phosphat-bond energy, Adv. in enzym. 1, 1941, 99.
- LOCKHART W.R. et POWELSON D.M., Staling in bacterial cultures, J. bact. 65, 1953, 293
- LODDER J. et KREGER van RIJ N.J.W., The yeasts. A taxonomic study, North Holland publis. Cy, Amsterdam 1952.
- LODDER J., SA6CHAROMYCES MARXIANUS HANSEN, Ant. van LEEUW. 12, 1947, 273.
- LONGMUIR I.S., Respiration rate of bacteria as a function of oxygen concentration, Bioch. J. 57, 1954, 81.
- LOHMANN K. et SCHUSTER P., Untersuchungen über die Carboxylase, Bioch. Z. 294 1937, 188.

LUCKWILL L.C., Le rôle des hormones végétales, End. 8, 1949, 188.

LUTERAAN Ph.J., La diffusion dans la gélose et ses applications à l'étude de la physiologie des microorganismes, Ann. parasit. 21, 1946, 356.

" , HANSENULA ELLIPSOIDOSFORMA n. sp., Rev. mycol., 19, 1954, 85

" , Stimulation de la croissance d'un HANSENULA par certains acides organiques, C.R. 236, 1953, 2.531.

" , De quelques relations entre des modifications morphologiques et des changements métaboliques obtenus chez des champignons par la restriction en azote d'un milieu de culture plus ou moins aéré, C.R. 239, 1954, 1.406

LUTERAAN Ph.J. et LANGERON M., Rôle physiologique de la lipogénèse chez les champignons, Ann. parasit. 24, 1949, 265-394.

LUTERAAN Ph.J. et DIENG F., Mutations provoquées par l'action directe ou indirecte sur la partie caroténoïde de l'insaponifiable des organismes fongiques, C.R. 226, 1948, 1.034

LUTERAAN Ph.J. et GUYOTJEANNIN Ch., Un procédé facile de culture sur lame, Rev. mycol. 17, 1952, 158.

" , Un processus insolite : la conjugaison observée au niveau d'éléments pseudo-mycéliens chez une levure : SACCHAROMYCES ACIDIFIANS (NICKERSON 1943) Rev. mycol. 17, 1952, 197

" , Modifications apportées au procédé de GUERRA pour l'étude de la fermentation par les levures zymatiques, Ann. I.P. 84, 1953, 819

" , Application de la méthode de FEULGEN-ROSSENBECK aux cultures sur lame gélosées, Ann. I.P. 86, 1954, 253.

LUTERAAN Ph.J. et DENIS J., Application de la méthode auxanographique de BELJERINCK à l'étude des facteurs de croissance, C.R. Soc. biol. 140, 1946, 294

LUTZ L., Traité de cryptogamie, Masson et Cie, Paris 1942.

LWOFF A., Les facteurs de croissance pour les microorganismes, Ann. I.P. 61, 1938, 580

MALENCON G., La série des Astérosporés, Tx crypt. dédiés à L. MANGIN, 1934

MANIL P., Microbes et actions microbiennes, Desoer, Liège.

MARKOVIC L., La respiration de la levure en présence d'alcool, Bull. Ac. serbe des sc. I, 1950, 83.

MARTINET I., Catalyse de forme et biologie, Bull. Soc. philom. 125, 1944, 240

MASON E.W., Annotated account of fungi received at the imperial mycological Institute (KEW, Surrey) 1925-28, 1933-37.

MASSART L. et HORENS J., L'assimilation d'azote aminé par les levures, Enzym. 15, 1953, 359.

MAUBLANC A., Maladies des plantes cultivées, 2 Maladies parasitaires, Baillière 1926

MEDLAR E.M., A new fungus, PHIALOPHORA VERRUCOSA, pathogenic for man, Mycol. 7 1915, 200.

MELIN E. et NANNFELDT J.A., Researches into the blueing of ground woodpulp. Särtryck ur svenska skogs vards föreningen tidskrift 1934, häfte 3-4, 397-616

MERY J., Action de quelques facteurs sur la croissance et la pigmentation des Rhodotorulacées. Ann. parasit. 24, 1949, 180

" et LUTERAAN Ph.J., RUBROBACTERIOPSIS RUGOSA nov. gen., nov. sp., II Caractères biochimiques, Ann. I.P. 84, 1953, 1.063.

- MEYERHOF O., Energy relationships in glycolysis and phosphorylation. Ann. N.Y. Ac. sc. 45, 1944, 377
- MOLLARD M., Oeuvres scientifiques rééditées ou résumées, 1936
- " , Sur la signification physiologique de l'acide oxalique, C.R. Soc. biol. 82, 1919, 351
- " , Influence de la nature de la source d'azote sur la production des acides organiques par *STERIGMATOCYSTIS NIGRA*, C.R. Soc. biol. 87, 1922, 967
- " , Action du gaz carbonique sur l'élongation des cellules, C.R. Soc. biol. 119, 1935, 347.
- " et ECHEVIN R., La nature de l'aliment réagit-elle sur les réserves ? C.R. 208, 1939, 136.
- MONOD J., Sur un phénomène nouveau de croissance complexe dans les cultures bactériennes, C.R. 212, 1941, 934.
- " , Recherches sur la croissance des cultures bactériennes, Hermann N° 911
- MORTON A.G. et MACMILLAN A., The assimilation of nitrogen from ammonium salts and nitrate by fungi, J. exp. bot. 5, 1932
- MOSES V., The effect of ammonia on the oxidation of glucose by *ZYGORHINCUS*
- MOELLERI, Bioch. j. 57, 1954, 547.
- MOUREAU M., Etude du potentiel d'oxydo-réduction de la gélose profonde, Ann. I.P. 78, 1950, 686.
- MRAK E.M. et PHAFF H.J., Yeasts, Ann. rev. of microb. 1948, I
- " , VAUGHN R.H. et HANSEN N.H., Yeasts occurring in souring figs, J. of bact. 44, 1944, 441
- " et BONAR L., Film yeasts from pickle brines, Zbl. f. Bakt., Par. und Inf. II Abt, 100, 1939, 289.
- NELSON W.O., Nutritional factors influencing growth and lipase production by *GEOTRICHUM CANDIDUM*, J. Dairy sc. 56, 1953, 143
- NICKERSON W.J., Studies on film forming yeasts. Acid production by *ZYGOPICHIA* and *ZYGOHANSENULA*, Mycol. 36, 1944, 224.
- " , Experimental control of morphogenesis in microorganisms, Ann. Ac. sc. N.Y. 60, 1954, 50.
- " , Studies in the genus *ZYGOSACCHAROMYCES*, I Transfer of pellicle-forming yeasts to *ZYGOPICHIA*, Farlowia 1, 1944, 468
- " , Studies on the physiological bases of morphogenesis in fungi, I The respiratory metabolism of dimorphic pathogenic fungi, The J. of gen. physiol. 33, 1949, 41.
- " , *ZYGOSACCHAROMYCES ACIDIFACIENS* : a new acetifying yeast, Mycol. 35, 1943, 66.
- " , Some trends in research of yeasts, Chron. bot. 7, 1943, 409.
- " et CARROLL W.R., On the metabolism of *ZYGOSACCHAROMYCES*, Arc. of bioch. 7, 1945, 257.
- " et CHADWYCK J.B., On the respiration of Dermatophytes, Arc. of bioc. 10, 1946, 81
- " et CHUNG C.W., Reversal of fluoride inhibition of yeast growth with glucose I-phosphate, Am. j. bot. 39, 1952, 669.
- " et THIMANN K.V., The chemical control of conjugation in *ZYGOSACCHAROMYCES*, Am. j. bot. 30, 1943, 94.
- " et WILLIAMS J.W., Nutrition and metabolism of pathogenic fungi, Ann. cryptog. et phytopath. 6, 1947, 130.

- NICOT-TOULOUSE J., Le monde méconnu des moisissures, Sc. et nat. 1954, N°5, 27
- NIELS NIELSEN, Untersuchungen über die Wirkung von Ancurin, Pyrimidin, Thiazol auf Hefen, Arc. f. Mikrob. 12, 1941-2
- NIETHAMMER A., Mikroskopisch Bodenpilze als Begleiter in Früchten und Samen, Arc. f. Mikrob. 10, 1939, 13
- " , Weitere Beiträge über Verbreitung und Leben mikroskopischer Bodenpilze, Arc. f. Mikrob. 12, 1941-2, 312.
- NORD F.F. et WEIDENHAGEN R., Handbuch der Enzymologie, Becker et Erler, Berlin 1940
- NORTHCOTE D.H. et HORNE R.W., The chemical composition and structure of the yeast cell wall, Bioch. j. 51, 1952, 323.
- OCHOA S., Enzymatic synthesis of citric acid and others reactions of the tricarboxylic acid cycle, 2ème cong. int. bioch. 1952, 73, Sedes, Paris.
- PALLADINE W. et IRAKLIONOFF P., La peroxydase et les pigments respiratoires chez les plantes, Rev. g. bot. 23, 1911, 225.
- PASTEUR Louis, Etudes sur la bière, Gauthier-Villars 1876.
- PEARSALL W.H., Le métabolisme azoté des plantes, End. 8, 1949, 99.
- PILLET P.E., Les mouvements des végétaux, P.U.F. N°569.
- PINTO-LOPES J., Contribution to the study of the nuclear structure in fungi, Portugal acta biol. série A, 2, 1949, 191
- PLANCHON L., Influence de divers milieux chimiques sur quelques champignons du groupe des Dématiées, Thèse Paris 1900, Masson et Cie
- PLANTEFOL L., La respiration chez les levures, Rev. cyt. et cytophys. vég. 1, 1934, 1
- " , Influence de la tension d'oxygène sur les échanges gazeux des levures. La fermentation propre des levures, Ann. physiol. 2, 1935, 243.
- " , Les oxydations complémentaires de la fermentation chez les levures, Ann. physiol. 2, 1935, 427.
- " , Démonstration du caractère extrinsèque d'oxydations provoquées par le glucose, C.R. 204, 1937, 1.886
- " , Sur la généralité des oxydations extrinsèques, C.R. 207, 1938, 83
- " , Cours de botanique et de biologie végétale, Belin, Paris.
- " , La cellule végétale, Belin, Paris.
- " et GAUTHERET R., Le glucose et la respiration des tissus végétaux, C.R. 218, 1939, 927
- POMPER S. et Mac KEE D.W., Flocculence in yeasts, Sc. 117, 1953, 62.
- PREVOT A.R., Rôle du potentiel d'oxydo-réduction dans le mode de croissance des bactéries en gélose profonde, C.R. Soc. biol. 127, 1938, 489.
- " et MOUREAU M., Technique de culture des anaérobies à l'air libre par emploi de la réductose, Ann. biol. elin. 7, 1949, 353.
- PRINGSHEIM H., Die Variabilität niederer Organismen, Springer, Berlin 1910
- PUNKARI L. et HENRICI A.T., A study of variations in a chromogenic asporogenous yeast, J. baet. 26, 1933, 125.
- " , Further studies in spontaneous variation of TORULA
- PULCHERRIMA, J. baet. 29, 1935, 259.

- QUASTEL J.H., Le métabolisme de l'azote dans le sol, End. 6, 1947, 129
 " , Deshydrogenations produced by resting bacteria, IV a theory of the mechanism of oxidations and reductions in vivo, Bioc. j. 20, 1926, 166.
 " , Bacterial enzyme reactions, Erg. Enzymf. 1, 1932, 209
 " , Enzyme formation in bacteria, Enzymol. 2, 1937, 37
- QUASTEL J.H. et WOOLDRIDGE W.R., The effects of chemical and physical changes in environment on resting bacteria, Bioc. j. 24, 1927, 148
- RAAF H., Beiträge zur Kenntnis der Fett- und Eiweissynthese bei *ENDOMYCES VERNALIS* und einigen anderen Mikroorganismen, Arch. f. Mikrob. 12, 1941, 132
- RABAUD E., Les phénomènes de convergence en biologie, Bull. biol. 1925, suppVII, 165
 " , Elements de biologie générale, Alcan 1928
 " , Transformisme et adaptation, Flammarion 1942
- RABENHORST L., Kryptogamen von Dtschl. Oest und der Schw., VI-IX, Fungi imperfecti
- RAPKINE L., Le rôle de l'oxygène libre dans le développement, C.R. 188, 1929, 650
 " , Sulfhydryl groups and enzymic oxido-reduction, Bioc. j. 32, 1938, 1.729
- RAULIN J., Etudes chimiques sur la végétation, Masson 1905 réimp.
- RAVEUX R., Synthèse microbiologique des matières grasses, Ann. nat. al. 2, 1948, 39
 " , Formation des lipides par *STRIGMATOCYSTIS NIGRA*, Bull. Soc. ch. biol. 30, 1948, 346
 " , Influence des concentrations relatives en phosphore et en magnésium du milieu sur le métabolisme d'*ASPERGILLUS NIGER*, C.R. 238, 1954, 1.254
 " , Influence des concentrations relatives en éléments du milieu, principalement en l'azote, sur les déviations métaboliques chez *ASPERGILLUS NIGER*, C.R. 238, 1954, 1.150
- REICHEL L., Biologische Fettsynthese, Angew. Ch. 53, 1940, 577
- REINHARDT, Das Wachstum der Pilzhyphen, Jahrb. f. wiss. bot. 23, 1892, 562
- RENAUD J., Biologie du vin, P.U.F. N°442
- RIBERAU-GAYON J., PEYNAUD E. et LAFON M., Recherches sur la genèse des produits secondaires de la fermentation alcoolique, Biol. méd. 1955, 457
- RIVALIER E. et SEYDEL S., Cultures minces sur lames gélées, colorées et examinées in situ en préparations définitives pour l'étude des cryptogames microscopiques, C.R. Soc. biol. 60, 1932, 181
- RIXFORD E. et GILCHRIST T.C., Two cases of protozoan (coccidioid infection of the skin and other organs), J. Hopkins hosp. repts 1, 1896, 209
- ROBBINS W.J., The assimilation by plants of various forms of nitrogen, Am. j. bot. 24, 1937, 243
- ROBINOW C.F., A study of nuclear apparatus of bacteria, Proc. roy. Soc. N° 860 130, 1942, 299.
- ROELOFSEN P.L., Mechanism of cell wall extension revealed in the fibrillar structure, 8ème cong. int. bot. 1954, sec. 9-10, Paris.
 " et HOETTE I., Chitin in the cell wall of yeasts, Ant. van Leeuw. 17, 1951, 27
- ROBBINS W.J., Effects of extracts of *PHYCOMYCES* upon its development, Am. j. bot. 27, 1940, 559

- ROGER H., Les oxydations en biologie, Tresse méd. 1940, N°17, p 413
- ROUX G. et LINOSSIER G., Recherches morphologiques sur le champignon du muguet, Arc. méd. exp. 2, 1890, 62 et 222.
- SABOURAUD R., Maladies du cuir chevelu, III Les maladies cryptogamiques, Les teignes, Masson et Cie 1910
- SACCARDO , Sylloge fungorum, 1886
- SACKS L.E. et BARKER H.A., Substrat oxydation and nitrous oxide utilization in denitrification, J. bact. 64, 1952, 247
- SAKAMURA T. et MAEDA K., On the assimilation of nitrate nitrogen by HANSENULA ANOMALA, Bot. mag. jap. 62, 1949, N°733-4, 94-
- " et MATZUSAKI E., The oxygen uptake by HANSENULA ANOMALA in connection with the nitrogen metabolism, Bot. mag. jap. 62, 1949, N° 733-4, 95-6.
- SANNIE ? Les mélanines, Exp. an. bioc. méd. 5, 1945, 128
- " , Pigments et substances antibiotiques des champignons, id. 6, 1946, 225
- SCHAEFFER P., Influence de l'oxygénation des cultures sur la teneur des bactéries en pigments respiratoires à base d'hème, C.R. 231, 1950, 381
- " , Recherches sur le métabolisme bactérien des cytochromes et des porphyrines, II Excrétion des porphyrines par culture anaérobie chez certaines bactéries aérobies facultatives, Bioch. bioph. acta 9, 1952, 362
- SCHENCK B.R., On refractory subcutaneous abscesses caused by a fungus possibly related to the SPOROTRICHIA, Bull. J. HOPKINS hosp. 9, 1898, 286
- SCHOPFER W.H., Le métabolisme de l'azote d'un microorganisme envisagé au point de vue des lois de l'allométrie, C.R. 204, 1937, I.127
- " , Recherches sur le métabolisme de l'azote d'un organisme acellulaire: PHYCOMYCES BLAKESLEANUS, Le rôle des facteurs de croissance, Protopl. 28, 1937, 381
- " , Recherches sur le métabolisme de l'azote d'un microorganisme, C.R. 203, 1936, 201
- " , Aneurine et hétérotrophie chez les microorganismes, Arc. f. mikrob. 9, 1938, II6
- " , Les facteurs de croissance des microorganismes, 8ème cong. int. bot., sec. 18-19-20, 1954
- " et BLUMER S., Untersuchungen über die Biologie von USTILAGO VIOLACEA (PERS.) FUCK, Arc. f. Mikrob. 9, 1938, 305
- SCHULTZ A.S. et POMPER S., Amino-acids as nitrogen source for the growth of yeasts, Arc. bior. 19, 1948, 184
- " et Mac MANUS D.K., Amino-acids and inorganic sulfur as sulfur source for the growth of yeasts, id. 25, 1950, 40
- SEE P., Les maladies du papier piqué, Doin, Paris 1919
- SKINNER C.E. et BOUTILHET R., Melibiose broth for classifying yeasts, J. bact. 53, 1947, 37
- SLATER E.C., Role of sulphydryl groups in the oxidation of pyruvate, Nature 170, 1952, N°4.336, 970
- SLOMINSKI P.P., Effet de l'oxygène sur la formation de quelques enzymes chez le mutant petite colonie de SACCHAROMYCES CEREVISIAE, C.R. 231, 1950, 375
- " , Excrétion de porphyrines par la levure en anaérobiose, C.R. 235, 1952, I.064.

- SMEDLEY Mac LEAN, The metabolism of fat, Methuen § C°, 1943
- SMITH G.M., Cryptogamic botany, vol I Algae et fungi, Mc Graw-Hill, N.Y. 1938
- SMITH L., Bacterial cytochromes, Bact. rev. 18, 1954, 106;
- SPIEGELMANN S. et MOZAWA M., On the inability of intact yeast cells to ferment their carbohydrates reserves, Arch. bioc. 6, 1945, 303.
- " et SUSSMAN, Energy metabolism of biosynthesis at the cellular level, Ann. rev. of physiol. 14, 1952, 97.
- STANDER R.Y., The cultivation and nutrient requirements for a chytridiaceous fungus RHYZOPHYCTIS ROSEA, J. of Bact., 43, 1942, 499.
- STEINBERG R.A., Growth of fungi in synthetic nutrient solutions, Bet. rev. 5, 1939, 327
- STEPHINSON M., Some aspects of hydrogen transfer, Ant. van Leeuw. 12, 1947, 35.
- " Bacterial metabolism, Longmans, Green § C°, 1949, 3ème éd.
- STOLKOWSKI J., Les diastases, P.U.F. N°434
- STOKES J., Nutrition of microorganisms, Ann. rev. of microb. 6, 1952, 29
- STREET H.B., Nitrogen metabolism of higher plants, Adv. in enzym. 9, 1949, 391.
- SUBRAMANIAN M.K., Chromosomes in yeasts, Nature 168, 1951, 472.
- SUMNER J.B. et MYRBACK K., The enzymes chemistry and mechanism of action, Ac. Press N.Y. 1950.
- SZENT-GYÖRGYI A., Studies on biological oxidation and some of its catalysts, Remy, Budapest 1937
- " , Les oxydations biologiques au niveau cellulaire, Exp. ann. bioc. méd. 2, 1939, 1.
- TABACHNICK J. et JOSLYN M.A., Formation of esters by yeasts, J. of bact. 65, 1953, 1
- TALICE R.V. et MACKINNON J.E., La valeur du voile des cultures en milieu liquide pour la classification des champignons levuriformes (Mycotorulées), C.R. Soc. biol. 61, 1932, 534
- TAMIYA Hiroshi, I le bilan matériel et l'énergétique des synthèses biologiques, Hermann et Cie, N° 214, 1935.
- TERROINE E.F. et WUMISER R., L'énergie de croissance; I Le développement de l' ASPERGILLUS NIGER, Bull. Soc. ch. biol. 4, 1922, 519
- " , TRAUTMANN S., BONNET H. et HEE A., L'énergie de croissance, IV Les rendements énergétiques dans le développement des microorganismes et dans la germination, en fonction de la concentration des aliments et de l'oxygène, et le problème de la consommation de luxe. Bull. Soc. ch. biol. 8, 1926, 534
- THORNE R.S.W., Génétique de la flocculence chez SACCHAROMYCES CREVISIAE, C.R. tx lab. Carlsberg, serie physiol., 25, 1951, 101.
- UMBREIT W.W., Respiratory cycles, J. cell. comp. physiol. 41, 1953, 39
- Van der WILT J.P., On the yeast CANDIDA PULCHERRIMA and its pigment, Thèse Delft 1952
- Van LAERE M.H., La chimie des fermentations, Masson § Cie, Paris 1935.

- Van NIEL C.B., ALLEN M.B. et WRIGHT B.E., On the photochemical reduction of nitrate by Algae, Bioch. bioph. acta 12, 1953, 67.
- Van NIEL C.B. et COHEN A.L., On the metabolism of CANDIDA ALBICANS, J. cell. comp. physiol. 20, 1942, 95.
- VENDRELY R. et C., Données récentes sur les acides nucléiques, Biol. méd. 1955, 297
- VERHOEVEN W. et GOOS J.J.C., True dissimilatory nitrate reduction, I Fate of the hydrogen donors in bacterial nitrate reduction, Ant. van LEEUW. 20, 1954, 93.
- VIAUD G., Les tropismes, P.U.F. N° 482.
- WAKSMAN S.A., Antagonistic relations of microorganisms, Bact. rev. 5, 1941, 231
- WALKER T.K., Acid formation in molds, Adv. in enzym. 9, 1949, 537
- WANG C.H., THOMAS R.C., CHELDELIN V.H. et CHRISTENSEN B.E., Conversion of acetate and pyruvate to aspartic acid in yeast, J. biol. chem. 197, 1952, 663
- WARBURG O. et NEGELEIN E., Über die Reduktion der Salpeter säure in grünen Zellen, Bioch. Zts 110, 1920, 66.
- WATTIEZ et STERNON , Elements de chimie végétale, Masson et Cie 1942
- WENT F.W. et THIMANN K.V., Phytohormons, N.Y. 1937
- WESTERDIJK J., On the cultivation on fungi in pure culture, Ant. van LEEUW. 12, 1947, 22
- WICKERHAM L.J. et BURTON K.A., Carbon assimilation tests for the classification of yeasts, J. of bact. 56, 1948, 363
- " et RETTGER L.F., A taxonomic study of MONILIA ALBICANS with special emphasis in morphology and morphological variation, J. of trop. med. VI et VII, 1939
- " , A simple technique for the detection of melibiose fermenting yeasts, J. of bact. 46, 1943, 501
- " , Recent advances in the taxonomy of yeasts, Ann. rev. of microb. 6, 1952, 263
- WHITE J., Yeast technology, Chapman and Hall 1954
- WINGE Ø., On the segregation and mutation in yeast, C.R. tx lab. Carlsberg, série physiol., 21, 1938, 235
- " , The genetic situation concerning fermentation in yeasts, Hereditas 6, 1952, 263
- " et LAUSTSEN O., On two types of spores germination and on genetic segregations in SSACCHAROMYCES demonstrated through single spore cultures, C.R. tx labo Carlsberg, série physiol. 22, 1937, 99
- " , Artificial species hybridization in yeast, id 21, 1938, 235
- " , SACCHAROMYCODES LUDWIGII, a balanced heterozygote, id 22, 1939, 357
- " , On a cytoplasmic effect inbreeding in homozygous yeast, id 23, 1940, 17
- WOLF F.T., The utilization of ^{carbon and} nitrogen compounds by USTILAGO ZEAE, Mycol. 16, 1953, 130
- WURMSER R., Les oxydations en biologie, 1927
- " , Les potentiels d'oxydo-réduction des systèmes biologiques, Exp. ann. bioch. méd. 1, 1939, 7.
- " , Biological oxidations, Ann. rev. of bioch. 20, 1951, 1
- WYSS-CHODAT F., Les levures, Bull. Soc. bot. Genève, 36, 1944, 110.

EMM F.W. et POLKES B.F., The regulation of respiration during the assimilation of nitrogen in *TORULOPSIS UTILIS*, Bioch. j. 57, 1954, 495

UDKIN , Enzyme variation in microorganisms, Biol. rev. 13, 1938, 93

ZELLER A., Enzymes of snake venoms and their biological significance, Adv. in enzym. 8, 1948, 459

ZOPF W., Die Pilze, Breslau 1890

SOMMAIRE

INTRODUCTION

PREMIERE PARTIE

Observations sur le développement des levures et du thalle de différents champignons filamenteux	3
--	---

CHAPITRE I

Différents aspects macroscopiques de développement du thalle	3
A. Levures et champignons levuriformes	3
1. Observations sur milieux solides : formation de colonies de levures	4
- a Colonie typique hémisphérique	4
- b Colonies se développant en épaisseur	5
- c Colonies membraneuses	5
- d Colonies extensives	6
- e Colonies se développant en profondeur	6
- f Résumé	7
2. Observations sur milieux liquides : la production de voile	7
B. Champignons filamenteux	8
- a Aspect typique habituel	9
- b Développement en hauteur	9
- c Développement en épaisseur	9
- d Thalles glabres	10
- e Thalles immergés	10
- f Thalles levuriformes	11
- g Cas de certains champignons très polymorphes	11
- h Résumé	12

CHAPITRE 2

Différents aspects microscopiques de développement du thalle	12
A. Levures et champignons levuriformes	13
1. Le mode de multiplication cellulaire	13
- a Le bourgeonnement	13
- b La scissiparité	14
2. L'élongation cellulaire et la filamentisation	14
3. Les processus de conjugaison	16
4. La formation d'asques	17
5. La chlamydosporulation	17
6. Résumé	18
B. Champignons filamenteux	18

I. L'extension mycélienne	18
- a L'allongement des membranes	19
- b La progression centrifuge du cytoplasme	19
- c La formation de cloisons mycéliennes	20
2. La production d'anastomoses	20
3. Le bourgeonnement	21
4. La scissiparité	22
5. La reproduction par conidies	22
6. La formation de spores aux dépens du thalle végétatif	23
7. Formations adventices	24
8. Résumé	24

DEUXIEME PARTIE

Action de certaines modifications systématiques du milieu de culture sur la morphogénèse	27
A. Introduction	
- a Objet des présentes recherches	27
- b Rappel historique	28
B. Action de l'aération	29
1. Aérobiose très restreinte	30
2. Aération habituelle	32
3. Résumé	33
C. Action de l'aliment ternaire	34
D. Action de différentes substances azotées	35
E. Action du nitrate de sodium	38
F. Action de la restriction en azote du milieu	40

TROISIEME PARTIE

Des changements métaboliques correspondants à des modifications de leur forme, chez quelques champignons, sous l'action du milieu	43
---	----

INTRODUCTION

43

TECHNIQUES EMPLOYEES

45

A. Partie microbiologique	45
I. Choix des organismes	45

2. Préparation des souches	45
- a Isolement	45
- b Purification	46
- c Contrôle	46
- d Conservation et repiquages	46
3. Ensemencement	47
4. Préparation des milieux de cultures	47
- a Récipients, bouchons	47
- b Stérilisation	47
- c Aération	47
- d Préparation	47
- e Substances fragiles et précautions générales	48
B. Partie chimique	48
1. La récolte	49
2. Les déterminations chimiques	50

RESULTATS EXPERIMENTAUX

	53
A. Influence de l'aération	53
1. Procédés d'étude	53
2. Les différences de sensibilité à l'aération	53
3. Influence de l'entraînement et de la forme ensemencée	56
- a Recherches sur PULLULARIA PULLULANS	56
- b " avec CANDIDA HUMICOLA	57
B. Influence de la nature de la source azotée	57
C. Influence de l'azote nitrique	61
1. Recherches sur PULLULARIA PULLULANS	61
2. Recherches avec HANSENULA ELLIPSOIDOSPORA	64
- a Influence de l'aération sur l'utilisation de l'azote nitrique	65
- b Influence de l'ammoniaque sur l'utilisation de l'azote nitrique	66
- c Influence de la forme ensemencée sur l'utilisation de l'azote nitrique	69
D. Influence de la restriction en azote du milieu de culture	71

QUATRIEME PARTIE

Action de traces de substances diverses sur le métabolisme et modifications morphologiques consécutives	81
---	----

A. Introduction	81
B. Action de la cystéine chez PULLULARIA PULLULANS	82
C. Action de l'aneurine chez HANSENULA ELLIPSOIDOSPORA	85
D. Action du fluorure de sodium chez HANSENULA ELLIPSOIDOSPORA	87
E. Action de l'acide malonique chez HANSENULA ELLIPSOIDOSPORA	88
F. Action de divers acides organiques chez HANSENULA ELLIPSOIDOSPORA	92
G. Comparaison des résultats obtenus dans la quatrième partie	93
 <u>INTERPRETATION DES RESULTATS ET DISCUSSION</u>	 95
A. Processus morphologiques intervenant dans le développement et la différenciation	95
B. Mécanisme de l'action du milieu	97
C. Nature de la progression centrifuge du cytoplasme	105
 <u>CONCLUSIONS</u>	 III
 <u>RESUME GENERAL</u>	 II9
- première partie	II9
- deuxième partie	I2I
- troisième partie	I24
- quatrième partie	I28
- discussion	I3I
 <u>BIBLIOGRAPHIE</u> (ouvrages consultés)	 I33
 <u>SOMMAIRE.</u>	 I49

DESSINS ET CLICHES AVEC LEUR COMMENTAIRE après la première partie entre les pages 26 et 27.

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

**“ LA CLASSIFICATION DES LEVURES ET LEUR DÉTERMINATION EN
PRATIQUE COURANTE. ”**

Vu et Approuvé :

Paris, le 10 Juin 1957

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

J. PERES

VU

et Permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

Jean SARRAILH

